Rita Margarida Martins dos Santos

Desenvolvimento e análise do perfil nutricional e antioxidante de um novo alimento produzido a partir de subprodutos da indústria queijeira, soro de leite de cabra e indústria hortofrutícola, morangos frescos não comercializáveis

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

Setembro 2018

· U C ·

Rita Margarida Martins dos Santos

Desenvolvimento e análise do perfil nutricional e antioxidante de um novo alimento produzido a partir de subprodutos da indústria queijeira, soro de leite de cabra e indústria hortofrutícola, morangos frescos não comercializáveis

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

Setembro 2018

· U C ·

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.

Ricardo Reis 1933,
heterónimo de Fernando Pessoa

Agradecimentos

Todas as palavras são poucas.

Em primeiro lugar quero agradecer ao primeiro impulsionador para que este projeto de dissertação de mestrado se concretizasse, o Professor Doutor Fernando Ramos. Agradeço a sua disponibilidade, paciência e acompanhamento ao longo destes dois anos de mestrado (mas também por todos os ensinamentos durante a licenciatura). Sem a sua ajuda para o estabelecimento de parcerias, não seria possível obter as matérias-primas para que fossem cumpridos os objetivos deste projeto, bem como a realização de todo o trabalho laboratorial. A sua ajuda foi decisiva para o sucesso deste trabalho.

Ao Professor Doutor Carlos Dias Pereira, agradeço todos os conhecimentos que me transmitiu em relação às temáticas mais técnicas, nomeadamente no que diz respeito aos métodos de processamento e tratamento do soro. Sem o seu auxílio seria impossível concretizar o objetivo primário desta dissertação.

Deixo aqui um agradecimento à Professora Doutora Conceição Castilho por toda a disponibilidade que teve ao longo do trabalho laboratorial.

Agradeço à minha instituição, Faculdade de Farmácia de Universidade de Coimbra não só por ter permitido a conclusão deste projeto, mas por me ter proporcionado cinco anos de academia que jamais esquecerei.

Agradeço à Escola Superior Agraria de Coimbra por ter cedido o espaço e materiais necessários ao tratamento e processamento do soro e morangos, e também ao Professor David Gomes por toda a atenção disponibilizada.

Não poderia deixar de agradecer à Valmarques LDA, em especial ao Sr. José por ter abraçado este projeto desde o início.

A todos os que contribuíram de forma direta e indireta para que este projeto de dissertação tivesse sucesso, os meus sinceros agradecimentos.

Ilda Martins, António Costa, Paula Martins, Jorge Reis, António Rosa, Daniela Costa e Bruno Santos, a vós dedico este trabalho.

Agradeço do fundo do coração, todo o vosso apoio (e esforço) e o amor incondicional que tornam os meus objetivos concretizáveis.

Na última década tem-se assistido a uma (nova) revolução na sociedade. As tendências do culto do corpo e da manutenção da saúde são temas atuais e preocupações diárias, dando-se-lhes até uma sistemática e objetiva relevância, induzindo no ser humano, de forma consciente e, às vezes até inconsciente, mudanças radicais nas escolhas alimentares e uma profunda alteração de alguns comportamentos, como por exemplo o combate ao sedentarismo.

É relevante o facto da preocupação do Homem não se restringir apenas ao bem-estar físico e mental, mas atualmente, também passar por uma preocupação que vai de encontro ao conceito de "uma só saúde" da Organização Mundial de Saúde (OMS) que engloba, a saúde humana, ambiental e animal. Assim, verifica-se que expressões como "desperdício alimentar" e "sustentabilidade" fazem parte do quotidiano, pois estão presentes um pouco por toda a parte, sendo os *media* um dos grandes responsáveis pela sua propagação.

A partir do exposto, este projeto de dissertação tem como principal objetivo o aproveitamento e valorização de subprodutos da indústria queijeira e hortofrutícola, o soro de leite de cabra e os morangos que não podem ser comercializados em fresco. Relativamente ao soro de leite de cabra, este foi devidamente tratado com recurso a técnicas como a pasteurização, desnate e ultrafiltração para que fosse possível aproveitar todas as suas proteínas num concentrado líquido de proteínas do soro (CLPS). No que diz respeito aos morangos (não possíveis de consumir em fresco devido a questões de calibre e/ou estética) foram devidamente lavados, o seu pedúnculo retirado, e, posteriormente, secos com recurso a ar comprimido o que permitiu o seu acondicionamento e congelação.

Estas técnicas levaram ao aparecimento de um produto novo que consiste numa bebida fermentada à base de CLPS (65 %) e polpa de morango (30 % de fruta e 5 % sacarose), a qual conjuga as mais-valias nutricionais das matérias-primas mencionadas.

A fim de comprovar a qualidade da bebida foram realizadas várias determinações químicas, para se verificar as respetivas percentagens de proteína (3,930-5,359), de humidade (77,720-77,722), de sólidos totais (22,278-22,280), de cinzas (0,500-0,550), de matéria gorda (0,166-0,166), de cloretos (0,357-0,570), de fósforo (0,393-0,394) e de fibra (12,500-12,800) que constituíram a composição nutricional. Foi também avaliado o teor em moléculas antioxidantes através da determinação dos compostos fenólicos totais expressos em

miligramas de equivalentes de ácido gálico/grama de solução (3,333-3,533) e flavonoides expressos em miligramas de equivalente de epicatequina/ grama de solução (4,733-5,366).

A avaliação da sua capacidade antioxidante foi executada através da determinação da capacidade de inibição do radical DPPH em miligramas de equivalentes de Trolox /grama de solução (0,105-0,108) e determinação do coeficiente de atividade antioxidante (268,519-291,666).

Concluiu-se, através dos resultados obtidos, que esta nova bebida pode ser uma alternativa segura e saudável ao leite e seus produtos derivados e que tem excelentes potencialidades para ser industrializada e comercializada. Cumpriu-se assim o duplo objetivo deste trabalho: uma solução para o desperdício alimentar e uma forma de otimizar e/ou aproveitar os recursos que surgem diretamente da não valorização dos produtos excedentes (e de qualidade) que emergem da indústria queijeira e da indústria hortofrutícola.

Palavras-chave: desperdício alimentar, sustentabilidade, subprodutos, valorização, soro de leite de cabra, morangos, bebida, composição nutricional, antioxidantes.

Abstract

In the last decade there has been a (new) revolution in society. The tendencies of body culture and health maintenance are current issues and daily concerns, giving rise to a systematic and objective relevance, inducing in the human being consciously and sometimes even unconscious radical changes in food choices and a change in some behaviors, such as the fight against sedentarism.

It is relevant that the concern of man is not only limited to physical and mental well-being, but also, nowadays, is also a concern that meets the World Health Organization (WHO) concept of "one health" that encompasses, human, environmental and animal health. Thus, expressions such as "food waste" and "sustainability" are part of daily life, since they are present a little everywhere, with the media being one of the main factors responsible for its propagation.

From the foregoing, this dissertation project has as main objective the utilization and valorization of by-products of the cheese and vegetable industry, whey resulting from goat's milk and strawberries, which cannot be marketed fresh. For goat's whey, it was properly treated using techniques such as pasteurization, skimming and ultrafiltration so that all its proteins could be harvested in a liquid whey protein concentrate (CLPS). With regard to strawberries (not possible to consume fresh, due to issues of caliber and / or aesthetics) were duly washed, their stalk removed, and subsequently dried using compressed air which allowed their packaging and freezing due.

These techniques led to the appearance of a new product consisting of a fermented beverage based on CLPS (65 %) and strawberry pulp (30 % fruit and 5 % sucrose), which combines the nutritional value added of the mentioned raw materials.

In order to verify the quality of the beverage, several chemical determinations were carried out to verify the respective percentages of protein (3.850-5.250), humidity (77.720-77.722), total solids (22.278-22.280), ash (0.500- 0.550), fat (0.166-0.166), chlorides (0.357-0.570), phosphorus (0.393-0.394) and fiber (12.500-12.800) - will determine the nutritional composition. As well as the content of antioxidant molecules by determining the total phenolic compounds expressed in milligrams of gallic acid equivalents/gram of solution (3.333-3.533) and flavonoids expressed in milligrams of epicatechin equivalent/gram solution (4.733-5.366).

The evaluation of its antioxidant capacity was performed by determining the capacity of inhibition of the DPPH radical in milligrams of Trolox /gram equivalents of solution (0.105-0.108) and determination of the coefficient of antioxidant activity (268.519-291.666).

keywords: food waste, sustainability, by-products, valorization, goat's whey, strawberries, beverage, nutritional composition, antioxidants.

AAC- Coeficiente de Atividade Antioxidante, do inglês *Antioxidant Activity Coefficien*

AEA- Agência Europeia do Ambinte

ALA- Alfa-lactolbumina, do inglês *Alpha-lactalbumin*

BAP- Balança Alimentar Portuguesa

BLG- Beta-lactoglobulina, do inglês *Beta-lactoglobulin*

BSA- Albumina bovina sérica, do inglês *Bovine Serum Albumin*

CLPS- Concentrado líquido de proteínas do Soro

DGAV- Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DGS- Direção Geral de Saúde

DPPH- 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil, do inglês *2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*

ECE- Equivalentes de Epicatequina, do inglês *Epicatechin Equivalents*

EFSA- Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar, do inglês *European Food Safety Authority*

ESAC- Escola Superior Agrária de Coimbra

EUA- Estados Unidos da Améria

ET- Equivalentes de Trolox

ETAR- Estação de Tratamento de Águas Residuais

FAO- Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do inglês *United Nations Food and Agriculture Organization*

FCV- Fator de concentração Volumétrica

GAE- Equivalentes de Ácido Gálico, do inglês *Gallic Acid Equivalents*

GMP- Glicomacropeptido

Ig´s- Imunoglobulinas

IMC- Índice de Massa *Corporal*

INE- Instituto Nacional de Estatística

ROS- Espécies Reativas de Oxigénio, do inglês *reactive oxygen species*

Trolox- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2 carboxílico, do inglês *6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid*

UNESCO- Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura, do inglês *United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*

UF- Ultrafiltração

Índice de Figuras

Figura I- Composição química aproximada de 100 g de morangos frescos……*23*

Figura II- Resumo das categorias de compostos antioxidantes presentes no morango……*24*

Figura III- Perdas de alimento na cadeia de abastecimento de fruta em Portugal……..…..…*30*

Figura IV- Perdas de alimento n cadeia de abastecimento dos lacticínios em Portugal…….*31*

Figura V- Balança Alimentar Portuguesa 2016……*34*

Figura VI- Unidade de pasteurização acoplada a centrífuga industrial (desnatadeira)……*42*

Figura VII- Esquema do processo de ultrafiltração……*43*

Figura VIII- Aparelho de ultrafiltração……...…..…*43*

Figura IX- Fluxograma da Metodologia de Obtenção do CLPS……..……..…*44*

Figura X- Concentrado de proteínas de soro de leite de cabra após fermentação……*45*

Figura XI- Morangos de variedade *San Andres* não comercializáveis em fresco……..…*46*

Figura XII- Aspeto final da bebida elaborada através de CLPS de leite de cabra e polpa de morango……..…...*47*

Índice de Tabelas

Tabela I- Concentração de lactose, matéria gorda e proteína no soro de leite de cabra concentrado……...……..…...*20*

Tabela II- Características nutricionais dos leites de cabra e vaca ……....…*36*

Tabela III- Composição nutricional da bebida formulada……..…*68*

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL **13**

I.A- A IMPORTÂNCIA DA ALIMENTAÇÃO SAUDÁVEL E SUSTENTÁVEL 14
I.B- A DIETA MEDITERRÂNEA E AS SUAS CARACTERÍSTICAS - UMA ALIMENTAÇÃO PRÓ-SAÚDE 16
I.C- A IMPORTÂNCIA DO CONSUMO DE PROTEÍNAS 18
I.D- O SORO DE LEITE DE CABRA COMO FONTE ALIMENTAR RICA EM PROTEÍNAS 20
I.E- OS MORANGOS E OS ANTIOXIDANTES- UM PEQUENO FRUTO COM GRANDES BENEFÍCIOS 22

CAPÍTULO II

O DESPERDÍCIO ALIMENTAR **27**

CAPÍTULO III

OBJETIVO E CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROJETO DE DISSERTAÇÃO **33**

III.A- O SORO DE LEITE DE CABRA 35
III.B- OS MORANGOS 38

CAPÍTULO IV

DESENVOLVIMENTO DO NOVO PRODUTO ALIMENTAR ATRAVÉS DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA **40**

IV.A- CONSTITUINTES BÁSICOS DA BEBIDA 41
IV.B- PREPARAÇÃO DOS INGREDIENTES BASE- SORO DE LEITE DE CABRA E MORANGOS 41

CAPÍTULO V

MATERIAIS E MÉTODOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL NUTRICIONAL E ANTIOXIDANTE DA BEBIDA FORMULADA **48**

V.A- CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL NUTRICIONAL DA BEBIDA 50
1. *Determinação da Percentagem de Proteína* *50*
2. *Determinação da Percentagem de Humidade* *52*
3. *Determinação da Percentagem de Sólidos Totais* *53*
4. *Determinação do Teor de Cinzas* *53*
5. *Determinação da Percentagem de Matéria Gorda Livre* *54*
6. *Determinação da Percentagem de Fósforo* *55*
7. *Determinação da Percentagem de Cloretos Solúveis em Água* *57*
8. *Determinação da Percentagem de Fibra* *59*

V.B- CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA BEBIDA 61
1. *Preparação e Extração dos compostos Antioxidantes da Amostra* *61*
2. *Determinação do Teor em compostos Fenólicos Totais* *62*
3. *Determinação do Teor em Flavonoides* *63*
4. *Determinação da Capacidade de Inibição do Radical DPPH* *64*
5. *Determinação do Coeficiente de Atividade Antioxidante* *65*

CAPÍTULO VI

APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS **67**

1. ANÁLISE DO PERFIL NUTRICIONAL 68
2. ANÁLISE DO PERFIL ANTIOXIDANTE 72

CAPÍTULO VII

CONCLUSÃO **74**

BIBLIOGRAFIA **77**

ANEXOS **85**

Capítulo I

Introdução Geral

I.A- A importância da alimentação saudável e sustentável

Nos últimos anos assistiu-se a uma evolução das sociedades que foi acompanhada pela redução da morbilidade e mortalidade por doenças infeciosas, passando a haver um predomínio das doenças crónicas, de causas multifatoriais.

No início do século XXI, o ser humano começou a debater-se com uma epidemia dessas doenças crónicas resultantes de maus comportamentos alimentares e de estilos de vida pouco saudáveis. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), entre outros exemplos, essa epidemia está relacionada com doenças do foro cardiovascular, oncológico, diabetes e obesidade. Esta última é muito preocupante, pois para além da sua gravidade, a obesidade tem grande impacto na evolução das outras doenças crónicas, pelo que é considerada a pandemia do século XXI (OMS, 2018). Sabe-se que podem ser muitas e diversificadas as causas que podem explicar os maus comportamentos alimentares, mas o *stress* do quotidiano aliado à falta de tempo, parecem ser determinantes para que uma "dieta variada e saudável" continue a ser uma tarefa difícil de se concretizar.

Passando para a realidade dos países *mediterraneus* (cf. latim), constata-se que, nos últimos 100 anos, foram muitas e significativas as modificações que o padrão de dieta tradicional sofreu. A alimentação desta zona adotou muitos dos hábitos alimentares das sociedades do Norte da Europa, o que contribuiu para um aumento do consumo de carne e gorduras derivadas dos animais, em prejuízo dos hidratos de carbono complexos e fibras vegetais. Também é cada vez mais frequente, o consumo de alimentos pré-cozinhados e processados o que aumenta, em grande escala, a ingestão de gorduras *trans* e gorduras saturadas em detrimento dos alimentos frescos. Estas mudanças alimentares associadas a uma escassa prática de exercício físico, estão cada vez mais relacionadas com o risco de se sofrer de doenças crónicas como as anteriormente referidas (Martinez *et al.*, 2018).

Felizmente, esta tendência começa a inverter-se. Já se constata uma ligeira alteração de comportamentos, o que se deve aos inúmeros alertas que vão chegando ao espaço público, das mais variadas instituições governamentais e não-governamentais, como também se deve a uma reforma de fundo que vai sendo imposta, de forma direta e indireta. Algumas destas mudanças têm origem na escola com as "novas" e mais recentes, diretivas educacionais ao nível dos currículos escolares, quer nas Ciências (o estudo da "Roda dos Alimentos") quer na Educação Física, privilegiando-se a atividade física no meio educacional até ao 12° ano onde começa a induzir-se nos jovens portugueses a perceção da "importância do exercício físico". Também a abordagem que é feita através de conteúdos programáticos como cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), consciencializa os mais novos e respetivas famílias para a

necessidade de adotarem hábitos alimentares saudáveis, serem mais ativos e lutarem contra a deposição excessiva de gordura no organismo.

Verifica-se que muitas destas medidas ou planos vão ajudando a reformar mentalidades e a calendarizar para o dia-a-dia atividades ou estratégias alimentares que promovem o chamado "culto do corpo" e proporcionam uma manutenção adequada da saúde. A título de graça pode-se dizer que dificilmente (e felizmente!) se voltará a ter, em catadupa, o que o nosso nobel da Literatura, José Saramago, retratou em *Memorial do Convento*[1], "(…) há quem morra por muito ter comido durante a vida toda, razão por que se repetem os acidentes apopléticos, primeiro, segundo, terceiro, e às vezes um basta para levar à cova, e se o acidentado provisoriamente escapou, fica leso de um lado, de boca à banda, sem voz se o lado foi esse, e também sem remédios que lhe acudam, tirando as sangrias, que se receitam às meias dúzias (…)".

Verificando-se que a alimentação também é de vital importância na promoção da saúde, torna-se relevante e quase obrigatório que se criem novos produtos alimentares seguros e que sejam alternativas aos já existentes. Produtos estes que devem ser completos do ponto de vista nutricional e cuja produção seja sustentável, de modo a que não se consumam irremediavelmente os recursos naturais. Então, o que se procura é que os novos alimentos estejam de acordo com uma dieta alimentar completa e saudável e que, do ponto de vista da sua produção ou fabrico, sejam sustentáveis para o meio ambiente.

Paralelamente, não podemos esquecer-nos que a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) – organização intergovernamental, que tem como objetivos principais (entre outros) erradicar a fome, a insegurança alimentar, a desnutrição e gerir e utilizar de forma sustentável os recursos naturais, incluindo a terra, a água, o ar, o clima e os recursos energéticos -, prevê que a população mundial aumente para 9 mil milhões até 2050 e que será necessário escalar a produção agrícola para que se assegure alimento a todos. Este aumento de produtividade terá necessariamente que ter na sua base serviços e produtos que melhorem a sustentabilidade, de modo a garantir alimentos ao maior número de pessoas possível sem prejudicar o planeta Terra (FAO, 2018).

É neste aspeto que os Mestres em Segurança Alimentar formados na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, dotados de competências não só nas áreas analíticas de avaliação da qualidade e segurança dos produtos, mas também em áreas como a garantia do alimento, podem ser uma das chaves para responder a um dos principais desafios da

[1] Memorial do Convento, 2005, 37.ª ed., Lisboa, Caminho, pág.27

sociedade atual: o combate às doenças crónicas relacionadas com uma má e deficitária alimentação e a produção de (novos) alimentos sustentáveis.

I.B- A dieta mediterrânea e as suas características - Uma alimentação pró-saúde

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO), a Dieta Mediterrânica (cujo conceito foi criado pelo cientista/fisiologista americano Ancel Keys em 1986, que publicou o resultado da sua investigação no "Seven Countries Study", considerada uma das maiores investigações da dieta alimentar e sua relação com vida saudável (Ancel, 1986)) é um património cultural imaterial da humanidade, ficando, desta forma, catalogada como um conjunto de conhecimentos – nas formas de produção, preparação e confeção dos alimentos – transmitidos de geração em geração, constantemente recriados pelas comunidades e capaz de lhes proporcionar um sentimento de identidade e de continuidade, promovendo o respeito pela diversidade cultural e a criatividade humana (UNESCO, 2013).

O padrão alimentar que se encontra por detrás deste conjunto de conhecimentos sob a forma de dieta é estudado desde os anos cinquenta do século passado. Pensa-se que a sua origem estará nas populações da Grécia Antiga. Contudo, nos dias de hoje, são muitas as características deste tipo de dieta que se encontram geograficamente dispersas. Podem encontrar-se semelhanças entre o tipo de alimentação que se pratica na Europa (Centro e Sul), Ásia Ocidental e Norte de África (DGS, 2018).

A Dieta Mediterrânica atingiu, ao longo dos tempos modernos grande notoriedade, por exemplo em 1993, na "Conferência Internacional para a Dieta Mediterrânea" (Ferreira, 2015), foram estabelecidas as principais características desta dieta, apontando-se para um consumo:

- abundante de alimentos de origem vegetal (produtos hortícolas, fruta, cereais pouco refinados, leguminosas secas e frescas, frutos secos e oleaginosos);
- de produtos frescos da região, pouco processados e sazonais;
- de azeite como principal fonte de gordura;
- baixo a moderado de laticínios, sobretudo de queijo e iogurte;
- baixo a pouco frequente de carnes vermelhas;
- frequente de pescado;
- baixo a moderado de vinho, principalmente às refeições.

A partir do consumo de azeite, principal fonte de ácido oleico, do pescado fonte de ácidos gordos polinsaturados e frutos secos, a par de um baixo consumo de ácidos gordos saturados e *trans* presentes nas carnes vermelhas, a dieta mediterrânea é uma peça chave na proteção da saúde cardiovascular e cérebro (Simopoulos, 2001). A riqueza em vitaminas, minerais e substâncias com elevado potencial antioxidante como flavonoides, catequinas, isoflavononas, antocianinas, e proantocianinas, entre outras, que se encontram nos produtos hortícolas, frutas, leguminosas frescas e ervas aromáticas condimentares, contribuem também para diminuir o risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e de vários tipos de cancro. A isto somam-se os cereais pouco refinados, dos quais se destacam o trigo e o arroz, em conjunto com a batata e com as leguminosas que representam as principais fontes alimentares de hidratos de carbono complexos, moléculas essenciais para a produção de energia celular (Márquez *et al.*, 2008).

Como já referido, a modernização das sociedades, o sedentarismo e a falta de tempo para a preparação das refeições, fez com que este tipo de Dieta Mediterrânea (a mais tradicional) sofresse algumas alterações, o que pode, a longo prazo, comprometer o aporte das propriedades benéficas que este tipo de regime alimentar pode contribuir para a saúde.

No entanto, e para que este processo de mudança seja ainda reversível, as pessoas devem ser educadas no sentido de fazerem as melhores escolhas alimentares possíveis. A dieta alimentar ideal deve incluir: azeite, frutas e vegetais (ricos em antioxidantes), peixe, iogurtes e queijo, frutos secos, cereais e vinho. Só desta forma poderemos continuar a afirmar que a Dieta Mediterrânea é uma das chaves (a par do exercício físico diário/frequente) para a manutenção de um estilo de vida saudável, nomeadamente no que diz respeito à proteção contra as doenças crónicas e outras patologias associadas ao *stress* oxidativo (Márquez *et al.*, 2008).

Quanto à adesão ao padrão alimentar mediterrâneo em Portugal, o Inquérito Alimentar Nacional e Atividade Física de 2015/2016 (IAN-AF) (Lopes, 2017) conclui que 27,8 % dos indivíduos do sexo masculino tem uma adesão elevada. A faixa etária que mais adere a este tipo de regime alimentar são os idosos com uma percentagem de 43,7 % e os adolescentes são o que representam a menor percentagem, caracterizando-se por apenas 8,6 %. Demograficamente, destacam-se as regiões Centro e Alentejo como as que mais adotam este regime alimentar e convém referir que a região Autónoma dos Açores é aquela que representa uma menor adesão.

Importa mencionar que o inquérito conclui ainda que a adesão elevada ao padrão alimentar mediterrânico ocorre nos indivíduos com melhor autoperceção do seu estado de saúde (Lopes, 2017).

I.C- A importância do consumo de proteínas

Segundo a EFSA (Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar) as proteínas são moléculas constituídas por aminoácidos unidos entre si através de ligações peptídicas. Estas ligações ocorrem entre o grupo carboxilo e o grupo amina que constitui cada aminoácido atribuindo uma forma linear (estrutura primária) à molécula que se está a constituir. Estas cadeias polipeptídicas são dobradas numa estrutura tridimensional e formam uma proteína. A estrutura primária já mencionada é pré-determinada no código genético. Os 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente nos organismos vivos são designados de aminoácidos proteinogénicos e são o monómero essencial para a construção de todas as proteínas que os constituem (EFSA, 2012).

Uma das formas de expressar a quantidade de proteína presente num organismo passa por expressar essa quantidade em moléculas de azoto (N_2). As proteínas provenientes da alimentação são um componente essencial da dieta fornecendo ao organismo o azoto (N) e os aminoácidos necessários para sintetizar e manter as cerca de 25.000 proteínas codificadas dentro do genoma humano, bem como outras substâncias metabolicamente ativas consideradas não-proteicas, mas que têm na sua formulação básica átomos de azoto, destacando-se, entre outros possíveis exemplos, as hormonas e os neurotransmissores.

Acrescenta-se ainda que em condições específicas e, por vezes, extremas, como a privação prolongada de fontes de glicose, leva a que os aminoácidos constituintes das proteínas dos músculos sofram um processo de desaminação, permitindo que as moléculas de carbono, outrora parte integrante das proteínas, possam ser utilizadas como substrato energético e/ou noutras vias metabólicas (EFSA, 2012).

Os vinte aminoácidos proteinogénicos são classificados como aminoácidos essenciais e não-essenciais. Desse grupo, os nove aminoácidos essenciais são: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina. Este grupo é assim designado, porque o organismo humano não é capaz de os sintetizar a partir de precursores naturais, a uma taxa superior àquela de que necessita de modo a satisfazer todas as exigências metabólicas. Assim, a alimentação é o veículo através do qual suprimos as necessidades em aminoácidos essenciais (EFSA, 2012).

A qualidade nutricional das proteínas da dieta é avaliada quanto à sua capacidade de fornecer azoto. Estas moléculas são indispensáveis para o crescimento e manutenção dos tecidos, ou seja, a ingestão suficiente de proteínas é um pré-requisito para a síntese proteica e manutenção da massa e função muscular.

É de senso comum que as principais componentes da estrutura óssea são as proteínas e o cálcio e uma alimentação onde estes componentes se encontram em quantidade insuficiente leva a consequências como o aumento da fragilidade óssea e por isso uma maior probabilidade para a ocorrência de fraturas.

As principais fontes alimentares proteicas podem ter origem animal como carne, peixe, ovos, produtos lácteos ou podem ter origem vegetal como são exemplo as leguminosas e os frutos secos. A maioria das fontes animais são consideradas como fontes de proteínas de alta qualidade, isto é, têm na sua constituição aminoácidos essenciais e a sua digestibilidade é considerada alta. Quanto às proteínas vegetais, estas por norma, têm uma composição mais carente em aminoácidos essenciais e/ou são de menor digestibilidade.

Nos países europeus, os principais alimentos que contribuem para a ingestão de proteína são a carne e produtos de carne e o leite e seus derivados.

Acresce ainda referir e a título de curiosidade que, de acordo com os resultados da EFSA (em 2017), o balanço de azoto disponível para adultos saudáveis deveria ser de 105 mg N/kg de peso corporal por dia o que equivale ao consumo de 0,66 g de proteína de alta qualidade/kg de peso corporal por dia (EFSA, 2017).

I.D- O soro de leite de cabra como fonte alimentar rica em proteínas

Como já mencionado, a população europeia elege para suprir as suas necessidades nutricionais em proteína, para além da carne e produtos cárneos, o leite e derivados lácteos; também estes são parte integrante de um regime alimentar mediterrâneo. Neste ponto muitas são as opções de escolha. Para além do leite de vaca também o leite de ovelha, búfalo e cabra são opções tidas em conta pelos europeus (EFSA, 2012). É de salientar que os produtos derivados de leite têm exercido, ao longo de séculos, um papel fundamental na dieta humana, sobretudo devido ao alto valor nutricional que os mesmos representam (Serra-Majem *et al.*, 2004).

Um produto alternativo aos demais anteriormente referidos, é o soro de leite de cabra que pode constituir uma fonte de proteínas mais saudável cujas multiplicidades de utilização começam agora a ser exploradas.

No presente projeto de dissertação, a fração de soro de interesse é aquela que é constituída pelas proteínas e que resulta do processo de ultrafiltração utilizado para as separar dos restantes componentes do soro de leite. A concentração de lactose, matéria gorda e proteína no soro de leite de cabra é a que se apresenta na Tabela I adaptada de (Araújo *et al.*, 2017).

Tabela I- Concentração de lactose, matéria gorda e proteína no soro de leite de cabra concentrado

	Concentração (g /100 g)
Proteína	5,96±0,30
Matéria Gorda	2,56±0,25
Lactose	15,62±1,08

Este produto pode ser uma mais-valia para a nutrição humana, uma vez que a sua composição consiste, entre outras moléculas, em proteínas e aminoácidos essenciais que se encontram limitadas noutras fontes de proteínas como as vegetais.

O soro de leite de cabra, nomeadamente a fração proteica ou como é comumente conhecida, *whey protein,* tem, na sua constituição, uma elevada concentração de aminoácidos e, em menor concentração (mas ainda assim significativa) moléculas que exercem funções

específicas e não específicas em todo o metabolismo celular e que podem ainda ter um efeito contra determinadas patologias, sendo elas as imunoglobulinas e as enzimas.

Em adição a estes factos pode-se ainda acrescentar que estas diferentes moléculas estimulam o crescimento e diferenciação celular, assim como auxiliam a regulação e manutenção do sistema imunitário (Brimelow *et al.*, 2017).

O que explica a existência destes compostos bioativos no soro de leite, são os processos de hidrólise que ocorrem durante o processamento do leite que dá origem ao queijo e que fazem com que as moléculas em causa se concentrem na fração que fica retida no soro; estes processos são executados por enzimas proteolíticas que tornam as imunoglobulinas e as enzimas aptas a exercer funções biológicas (Hinrichs, 2004).

Estudos científicos apontam ainda como funções das moléculas da fração proteica do soro, a capacidade em auxiliar o organismo na redução da gordura corporal, na regulação da tensão arterial e funções semelhantes às de agentes antimicrobianos (Groziak *et al.*, 2000).

Quanto à composição das proteínas do soro estas podem ser classificadas em dois diferentes grupos:

- fração maior;
- fração menor.

A fração maior tem na sua constituição BLG (Beta-lactoglobulina) sendo esta a maior proteína do soro com uma representação percentual que se encontra entre os 45 % e os 57 %; o seu peso molecular muito elevado permite-lhe resistir ao ácido do estômago sendo totalmente absorvida no intestino delgado. Segue-se a ALA (Alfa-lactoalbumina) com uma percentagem entre 15 % a 25 %, e que se caracteriza por ser de rápida e fácil digestão e por conter na sua estrutura cerca de 6 % de triptofano, fazendo da fração proteica do soro a maior fonte alimentar deste aminoácido. Além disso, ainda apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias patogénicas como o *Staphylococcus aureus* e a *Klebsiella pneumoniae* (Haraguchi, 2006). A BSA (Albumina bovina sérica) representa cerca de 10 % e está associada à síntese de glutationa (importante molécula de combate aos radicais livres) (Sies, 1999). Por fim, as Ig´s (Imunoglobulinas) cujas principais funções residem no auxílio à imunidade e atividade antioxidante e o GMP (Glicomacropéptido) que é um péptido resultante da hidrólise da caseína durante o processo de coagulação do queijo. É resistente ao calor e pH e por isso ultrapassa os fenómenos de digestão; a sua elevada carga negativa permite a ligação a minerais o que favorece a sua absorção no epitélio intestinal (Haraguchi, 2006).

No grupo correspondente à fração menor encontram-se a lactoferrina, beta-microglobulinas, gamaglobulinas, lactoperoxidase, lisozima, lactolina, relaxina e lactofano, entre outros (Haraguchi, 2006).

I.E- Os morangos e os antioxidantes- Um pequeno fruto com grandes benefícios

Os morangos são, desde sempre, uma das espécies de fruto mais apreciada. Não só devido à sua atrativa cor, mas também devido à sua textura e sabor únicos. São uma fonte de compostos muito nutritivos como minerais, vitaminas, ácidos gordos, fibra e antioxidantes. Sabe-se que a concentração de todas estas moléculas difere com a variedade de fruto em questão, as condições ambientais durante a cultura e os métodos de processamento antes, durante e depois da sua comercialização (Basu *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, estudos epidemiológicos reconhecem que o consumo destes frutos tem um efeito protetor contra doenças crónicas e, mais recentemente, apontam que o consumo de morangos traz benefícios na melhoria de patologias associadas ao sistema nervoso e perda de memória associada ao envelhecimento, bem como na melhoria de respostas inflamatórias (Manganaris *et al.*, 2014).

De forma mais aprofundada pode-se afirmar que os morangos representam uma escolha acertada no que diz respeito a uma alimentação saudável, pois apresentam um conteúdo interessante em fibra e frutose que exercem, em conjunto, um efeito controlador sob a concentração de açúcar no sangue, e acresce o facto da fibra ter o efeito de tornar o processo digestivo mais lento e por isso a ingestão de morangos proporciona uma sensação de saciação mais prolongada.

Este fruto é também uma fonte de ácidos gordos polinsaturados, os quais se encontram nas pequenas sementes que cobrem o fruto. Releva-se para o facto de que o consumo de 250 g de morango pode suprir as necessidades em folato (Vitamina B9) até 30 % do valor recomendado pela EFSA (EFSA, 2014). Porém, outras vitaminas fazem parte da sua constituição como a A, E, K, riboflavina e tiamina. Destaca-se ainda a sua riqueza em sais minerais essenciais como o potássio, fósforo, sódio, cálcio e manganês (Giampieri *et al.*, 2012).

De forma sintetizada, apresenta-se na imagem esquemática seguinte (Figura I) a composição química de 100 g de morangos frescos.

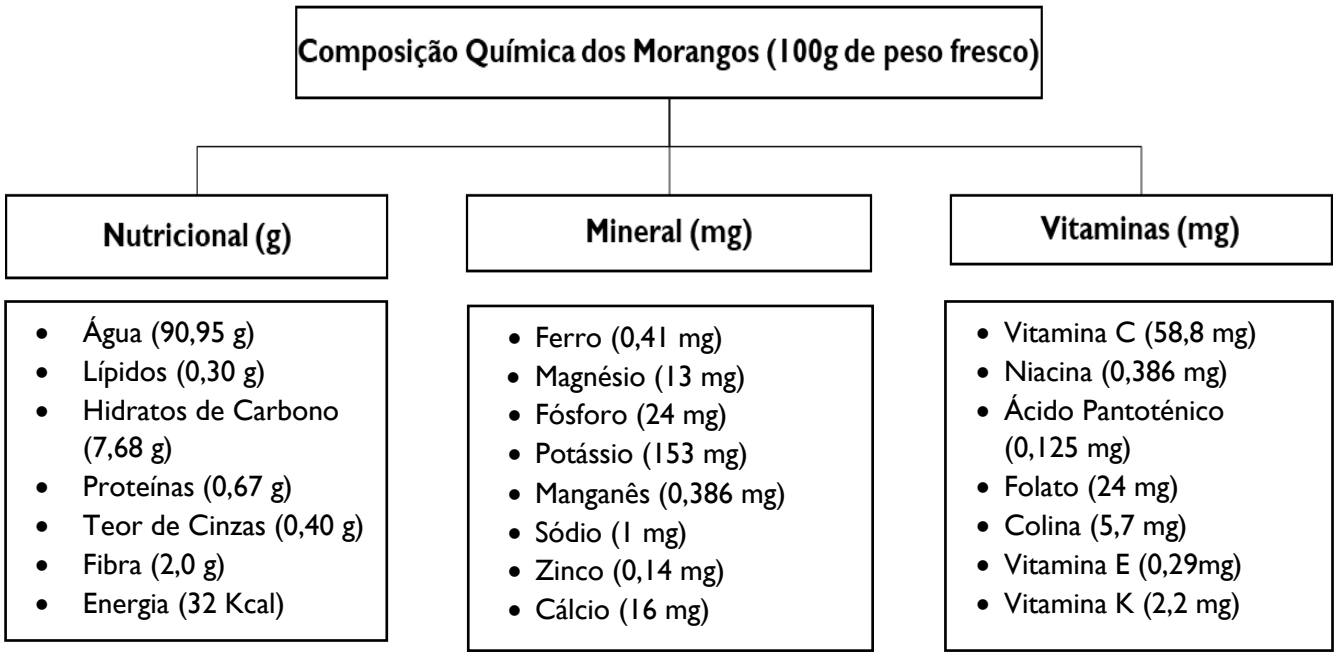


Figura I- Composição química aproximada de 100 g de morangos (Afrin *et al.*, 2016).

No que diz respeito ao conteúdo dos morangos em antioxidantes este pode dividir-se em dois subgrupos, os compostos:

- mais abundantes;
- menos abundantes.

O conjunto dos compostos menos abundantes tem, na sua constituição, o grupo das moléculas carotenoides que englobam a maioria dos pigmentos que se encontram na natureza e que se subdividem em carotenos e xantofilas, como são exemplo o β-Caroteno (pró-vitamina A), um precursor da síntese de vitamina A e a Zeaxantina (Skrovankova *et al.*, 2015). Do grupo menos abundante faz ainda parte a vitamina E.

Por seu turno, na divisão mais abundante, estão o ácido ascórbico (Vitamina C) e os compostos fenólicos. Estes constituem, sem dúvida, o grupo mais extenso de moléculas antioxidantes e englobam os ácidos fenólicos, os flavonoides, os taninos e os estilbenos.

O grupo dos ácidos fenólicos subdivide-se em ácidos:

- hidroxibenzóicos;
- hidroxicianímicos.

Dentro dos flavonoides encontramos a subcategoria das antocianinas, moléculas responsáveis pela cor vermelha vibrante dos morangos, as flavonas e os flavonóis que incluem os seus monómeros (+)-catequina e (-)-epicatequina.

Os taninos são classificados de acordo com a sua forma condensada ou hidrolisada e nos morangos os que ocorrem com maior frequência são taninos na forma hidrolisada. O conjunto dos estilbenos tem, na sua estrutura, um esqueleto de carbono C_6-C_2-C_6, e deste grupo o composto mais estudado é o resveratrol, que apesar de surgir em pequenas concentrações encontra-se presente nos morangos (Manganaris *et al.*, 2014).

Para além dos referidos muitos são os compostos bioativos da família dos antioxidantes que se encontram neste fruto, quer seja em maior ou menor concentração, contudo não é possível fazer referência a todos e por isso os antioxidantes mencionados são aqueles cuja concentração é mais relevante no fruto *per se*.

A figura II, pretende esquematizar a constituição em moléculas com capacidade antioxidante presentes no morango.

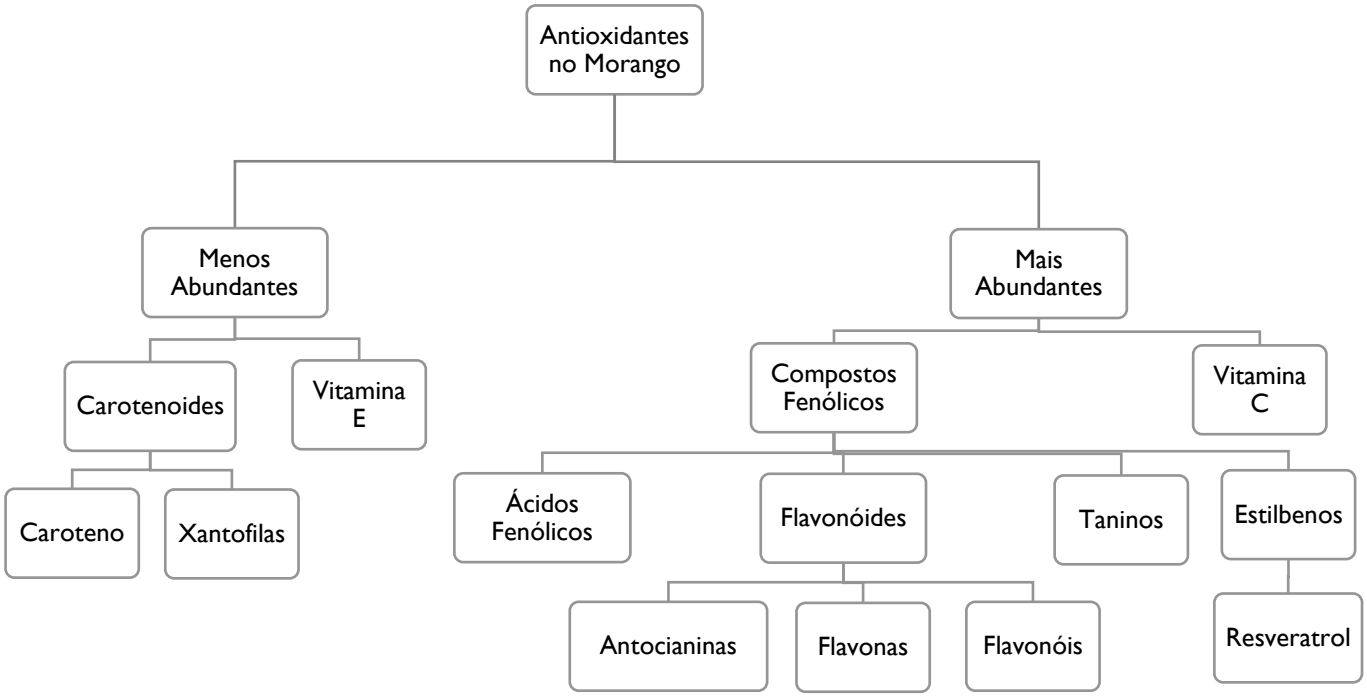


Figura II- Resumo das Categorias de Compostos Antioxidantes presentes no morango (Giampieri, 2014).

Do ponto de vista nutricional, e para que estas moléculas exerçam o seu efeito sobre o metabolismo celular, têm que ser absorvidas, pois só dessa forma se pode avaliar se têm ou não propriedades preventivas contra determinadas patologias. Existem alguns estudos científicos em que se avalia a biodisponibilidade destes compostos. As conclusões dos mesmos, sugerem que esta absorção é bastante significativa, nomeadamente no que diz respeito à Vitamina C, aos carotenoides e antocianinas (Afrin *et al.*, 2016).

Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que os compostos acima descritos exercem inúmeras funções, nomeadamente no combate aos radicais livres que, de acordo com o já descrito, podem ter várias origens. Esses estudos revelaram que os antioxidantes do morango auxiliam a diminuição da concentração de espécies reativas de oxigénio (ROS), quelatam iões metálicos que podem exercer toxicidade, inibem processos que levam a danos no ADN e diminuem a peroxidação lipídica (Basu *et al.,* 2012).

Muito sumariamente identificam-se, a título de exemplo, alguns resultados concretos de ensaios clínicos e epidemiológicos realizados para comprovar os benefícios do consumo deste tipo de fruta:

- Função cardioprotetora - a suplementação com compostos fenólicos, *in vivo* e *in vitro*, demonstrou que os mesmos levam a uma diminuição do risco de se sofrer de doenças cardiovasculares; o aumento do consumo de antocianinas (através de um enriquecimento da dieta em morangos) revelou um efeito muito positivo na diminuição do risco de se sofrer de enfarte do miocárdio. Também no combate à hipertensão as propriedades vasodilatadoras identificadas nos flavonoides (devido à sua estrutura química) demonstraram ter um efeito atenuador (Afrin *et al.*, 2016);
- Combate à *Diabetes Mellitus* - num estudo observacional, verifica-se que existe uma relação entre o aumento do consumo de morangos e a redução da incidência desta patologia. Um estudo pré-clínico revelou que a suplementação com morangos, em que a fração de flavonoides foi aumentada, inibe a absorção e o transporte de glucose de forma exagerada, permitindo a normalização da glicémia. Por último, num estudo *Cohort* identificou-se a relação entre um maior consumo de frutos vermelhos (nos quais se incluíam os morangos) e um menor risco de sofrer da *Diabetes* do *tipo II* (Mandave, 2017);
- Proteção do sistema nervoso - apesar de não serem totalmente conhecidos os processos através dos quais ocorrem as disfunções no sistema nervoso, sabe-se que estas estão relacionadas com o aumento da idade e com a acumulação de danos provocados por moléculas radicais que têm como consequências a oxidação de proteínas, enzimas e membranas lipídicas essenciais, para que as células do sistema nervoso sobrevivam e comuniquem entre si. Devido ao efeito que os antioxidantes têm na eliminação destes radicais, começaram então os primeiros estudos clínicos baseados na suplementação da dieta com alimentos ricos em antioxidantes. Algumas das conclusões que daí surgiram são de que, uma dieta onde o consumo de morangos e outros frutos vermelhos é privilegiado pode influenciar positivamente a função cognitiva em humanos; o consumo de uma maior quantidade de flavonoides está

associado a uma atenuação de 10 anos face ao período normal em que surgem os primeiros sintomas de declínio cognitivo (Willis *et al.*, 2009);

- Efeito sobre o cancro - muitos são os estudos em modelos celulares de vários tipos de cancro que, entre outos, incluem o cancro da próstata, ovários e melanoma. Para estes em específico, nos últimos anos, têm sido adotados tratamentos com extratos de morangos que demonstram ter a capacidade para inibir a proliferação celular (Giampieri *et al.*, 2017).

Um flavonoide que tem sido amplamente estudado é o campferol. Este está presente nos morangos e tem demonstrando atividade antiproliferativa e apoptótica nas células do cancro do ovário (Forbes-Hernandez *et al.*, 2016).

Mais investigações *in vivo* devem ser implementadas para que se descodifiquem os mecanismos por detrás dos potenciais efeitos dos componentes dos morangos na melhoria da saúde e/ou prevenção e auxílio para a cura de determinadas patologias.

Este fruto pode ser uma importante ferramenta para a prevenção de doenças crónicas ou para auxílio às terapias tradicionais e para tal muitos detalhes devem ser estudados como por exemplo a dose certa de morangos, as interferências entre os seus compostos e as terapêuticas utilizadas (medicamentosas ou não) e a relação temporal entre o consumo de morangos e a incidência destas doenças. Também os resultados já obtidos até ao momento devem ser validados pelas autoridades competentes.

Quanto a esta questão, a EFSA emitiu um comunicado que visa esclarecer se a relação entre as alegações de saúde feitas ao consumo de antioxidantes dos morangos e os seus efeitos sobre determinadas patologias englobam ou não provas científicas suficientes para que se possam ter como certezas, esses possíveis efeitos. Neste parecer, a Autoridade Europeia alega que mais estudos científicos em humanos devem ser feitos, pois apesar dos resultados positivos já obtidos, a sustentação científica não é ainda suficiente, uma vez que existem muitas variáveis ainda por avaliar como as anteriormente referidas (EFSA, 2011).

No entanto, não deixa de ser importante analisar qual o padrão de consumo de vitaminas e antioxidantes por parte da população portuguesa.

Em termos gerais sabe-se que, os idosos são os que apresentam maiores percentagens de carência, sendo que revelam muitas vezes valores abaixo das necessidades médias da população. Para a vitamina C observaram-se percentagens abaixo das necessidades médias entre 15 % e 30 %. Contudo, os micronutrientes com maior proporção da população abaixo das necessidades médias, a nível nacional, são o cálcio e os folatos, com percentagens próximas dos 50 % no sexo feminino (Lopes, 2017).

Capítulo II

O Desperdício Alimentar

A temática do desperdício alimentar é bastante complexa e encerra em si uma série de questões, quer de âmbito científico e social, quer económico e ambiental. Deste modo, pode afirmar-se que falar de desperdício alimentar é tipicamente discutir questões ligadas à sustentabilidade quer seja ela económica, social ou ambiental.

Sabe-se que "Cerca de um terço dos alimentos produzidos no planeta é perdido ou desperdiçado. Quando mais de mil milhões de pessoas em todo o mundo vão para a cama com fome, é impossível não nos perguntarmos: o que se poderá fazer a este respeito?" (Agência Europeia do Ambiente, 2012).

Uma recente Resolução do Parlamento Europeu, propõe que até 2025 ocorra a redução do desperdício alimentar para metade e aponta como principais fatores de influência para a alteração dos comportamentos dos produtores, indústria e consumidores, a subida dos preços dos alimentos a nível global, o impacto dos *media* na sensibilização para este problema e a segurança e garantia alimentar (Parlamento Europeu, 2018).

Em 2011, um estudo da FAO revelou que um terço da produção alimentar em todo o mundo é desperdiçada. Nos países industrializados, a maioria dos alimentos são desperdiçados ao nível da distribuição e do consumo final, enquanto que nos países em desenvolvimento o desperdício acontece sobretudo no início da cadeia, nas fases de colheita, pós-colheita, processamento e armazenamento dos produtos alimentares. Desta forma, é inegável que o volume do desperdício alimentar representa uma parte importante dos alimentos produzidos e que este volume é responsável por um impacto ambiental de dimensões também elas demasiado elevadas (FAO, 2011).

Os recursos naturais como o solo e água são usados e levados ao esgotamento ao serviço de uma "produção desperdiçada".

A FAO aponta para um aumento na procura de alimentos em cerca de 50 % entre 2009 e 2030, enquanto projeta que, para ser possível alimentar a população de 9 mil milhões que se estima existir em 2050, a produção alimentar deverá aumentar 20 %. Neste ponto impõem-se, então as preocupações com:

- a segurança dos alimentos;
- a garantia alimentar.

Estas preocupações justificam-se pelo aumento necessário de produção, pois irá levar a um desequilíbrio (sem retorno) na utilização dos recursos naturais e as condições em que os alimentos serão produzidos levarão necessariamente a uma diminuição da segurança dos alimentos devido ao aumento de contaminantes (por exemplo, fertilizantes) que terão que ser forçosamente utilizados para que seja possível maximizar a produção e alimentar a população mundial.

Paralelamente a todas estas questões, não se pode desprezar o fenómeno da fome. Desperdício e falta de alimento são parte de uma mesma equação e a existência de 870 milhões de pessoas subnutridas e um outro tanto de pessoas com excesso de peso ou obesidade (de acordo com os dados mais recentes da FAO), constituem fatores de peso para que se caminhe no sentido de reduzir o desperdício alimentar (FAO, 2015).

Concomitantemente, a centralização da cadeia alimentar e de consumo nas zonas urbanas tem vindo a provocar um alongamento das cadeias de abastecimento de alimentos, distanciando cada vez mais o produtor do consumidor. Quanto maior for o número de agentes intermediários na cadeia de abastecimento, maiores serão as necessidades de transporte e mais tempo demora o produto a chegar ao consumidor final, o que culmina num maior número de perdas de bens alimentares.

Em Portugal, os dados sobre o desperdício alimentar estimam que cerca de 17 % das partes comestíveis dos alimentos produzidos para consumo humano, são perdidas ou desperdiçadas, o que corresponde a cerca de 1 milhão de toneladas por ano. Estes dados indicam também que a maior parte das perdas ocorrem na fase inicial da cadeia de abastecimento, sendo que é no setor dos produtos hortofrutícolas que ocorre o maior desperdício - ¾ dos bens produzidos não chegam ao consumidor final.

Por outro lado, é na fruta que ocorrem as maiores perdas nos retalhistas, em especial, nos tipos de fruta que apresentam períodos de consumo muito elevados como é o exemplo do morango no seu período de oferta máxima, tal como irá ser relatado. O facto de se tratar de um produto perecível dificulta então a gestão de *stock*, levando a que se deitem ao lixo vários quilogramas de morangos por dia no período referido (Pereira, 2014).

A figura III que a seguir se apresenta resume como se distribuem as perdas de alimentos na cadeia de abastecimento das frutas em Portugal, comprovando-se pela sua análise que é durante o processo de distribuição que ocorre o maior desperdício de produtos (Baptista *et al.*, 2012).

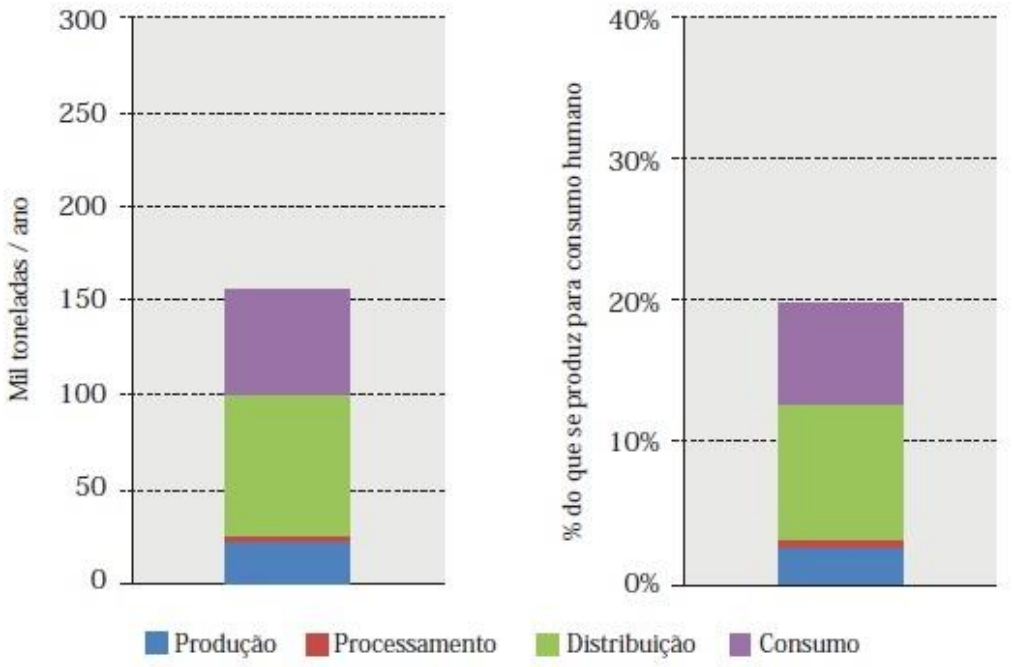


Figura III- Perdas de alimento na cadeia de abastecimento de Fruta em Portugal (Baptista *et al., 2012)*.

Nos lacticínios, a questão do desperdício não é muito diferente. Estes são produtos em que Portugal é praticamente autossuficiente e regista uma produção elevada. Por efeito de escala, é também neste setor que as perdas na produção são mais elevadas, chegando às 47 mil toneladas de desperdício por ano. Nestas toneladas inclui-se, necessariamente, todo o soro que é produzido no fabrico de queijo e que não é devidamente aproveitado. Neste caso, a questão do impacto ambiental é ainda mais gravosa no sentido em que as normas legais limitam (mas não impedem) a sua deposição no meio ambiente e o soro é maioritariamente tratado pelas indústrias como um resíduo, sendo apontado como um dos principais fatores de poluição das águas no nosso país.

A figura IV resume a distribuição das perdas de alimentos no setor dos lacticínios em Portugal, comprovando-se que é na etapa da produção que ocorre grande parte do desperdício (Baptista *et al*., 2012).

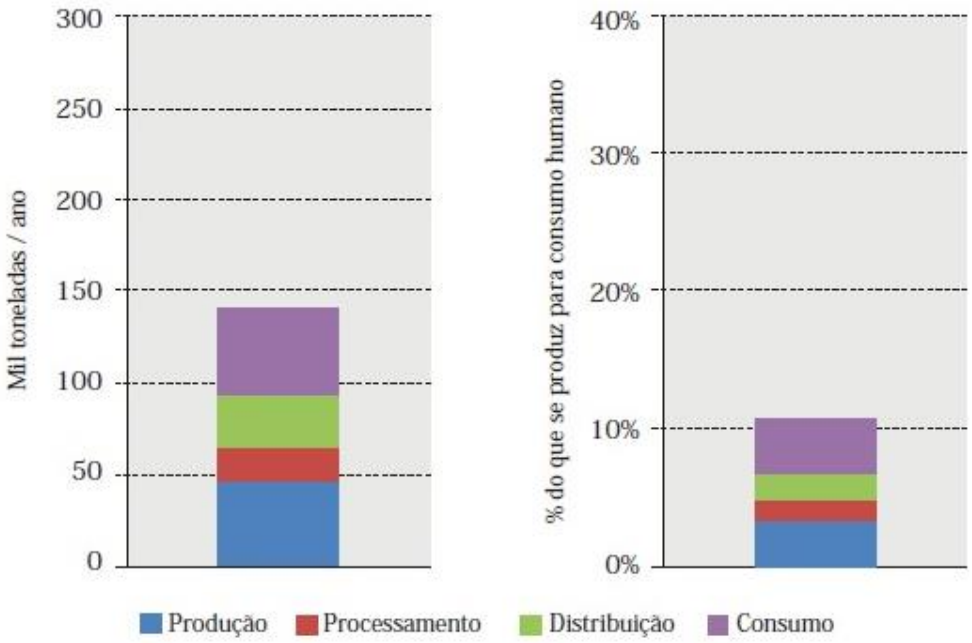


Figura IV- Perdas de alimento na cadeia de abastecimento dos Lacticínios em Portugal (Baptista *et al*., 2012)

Na última fase da cadeia de abastecimento – consumo – as perdas também são igualmente significativas.

O pão e a fruta são dos produtos mais desperdiçados pelas famílias. Em Portugal estima-se que cada pessoa, por ano, desperdice 132 kg de alimentos. Este valor encontra-se abaixo do valor médio estimado pela FAO para a Europa, que indica que, por pessoa, são desperdiçados 280 kg de alimentos ao ano (FAO, 2011).

O impacto ambiental que o desperdício alimentar provoca não se limita à exploração excessiva dos recursos naturais como o solo e a água. Todas as toneladas de alimentos cujo fim de vida é o aterro correspondem, na União Europeia, a 17 % do total de emissões de gases com efeito de estufa, como é o exemplo do gás metano (FAO, 2015).

Desperdício Alimentar e Sustentabilidade são problemáticas sérias e que devem ser combatidas pelo esforço combinado entre todos os agentes da cadeia de abastecimento (do produtor ao retalhista), mas também passa pela sensibilização do consumidor nomeadamente na alteração dos seus hábitos e na escolha de produtos alimentares mais sustentáveis.

O desperdício alimentar e a poluição (ou impacto ambiental) podem ser diminuídos e o aproveitamento dos subprodutos da indústria pode constituir uma parte da solução. Devidamente valorizados estes subprodutos podem ser incorporados em novos alimentos

seguros e de características nutricionais adequadas ao consumo de todos. É, pois, importante referir que "desperdício alimentar" não é mais do que considerar um alimento próprio para consumo, como um resíduo.

Capítulo III

Objetivo e Contextualização do Projeto de Dissertação

Em termos económicos, o setor das indústrias alimentares representou no ano de 2016, 10,5 mil milhões de euros, sendo por isso a principal atividade da produção industrial nacional com 15,2 % do total de mercado. Constata-se, assim que é uma área onde a evolução e a inovação devem ser constantes de modo a que se satisfaçam as necessidades dos consumidores bem como as suas preferências (INE, 2017).

Apesar desta dominância de mercado, a Balança Alimentar Portuguesa (BAP), ferramenta que disponibiliza indicadores de referência que avaliam a nível nacional, a disponibilidade, a procura e as tendências de consumo alimentar, chega a conclusões que não deixam de ser preocupantes.

Para o ano de 2016, a BAP conclui que a distribuição das quantidades de produtos alimentares disponíveis diariamente para o consumo *per capita,* quando comparada com o padrão alimentar recomendado pela Roda dos Alimentos, revela uma distorção face ao que seria de esperar.

Surge então a necessidade de se procurar alternativas para colmatar estas falhas.

A figura V demonstra a diferença que existe entre a percentagem de alimentos produzidos em Portugal para consumo *per capita* e aquilo que seria de esperar face à recomendação de consumo *per capita* demonstrado pela roda dos alimentos.

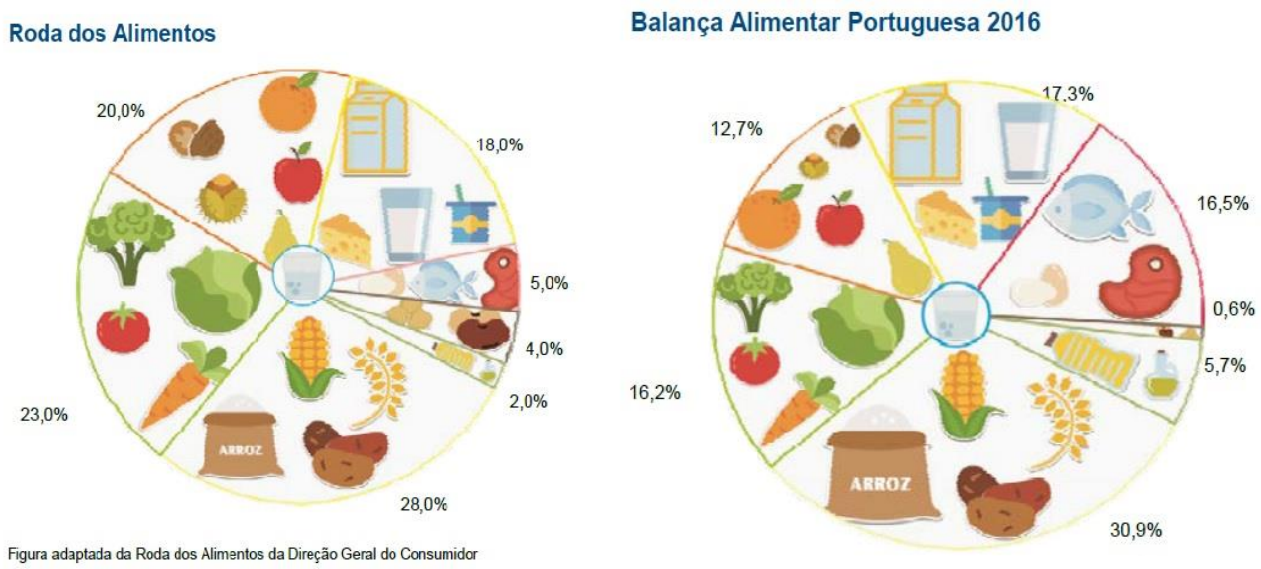


Figura V- Balança Alimentar Portuguesa 2016 (alimentos disponíveis para consumo) e Roda dos Alimentos (alimentos necessários para consumo) (Instituto Nacional de Estatítica, 2017).

Pela análise da figura rapidamente se constata que existe um desvio negativo do grupo "Leite e produtos lácteos" com uma percentagem de 17,3 %, bem como o dos "Frutos" com um valor percentual de 12,7 % e dos "Hortícolas" com 16,2 % apresentando quantidades deficitárias face à Roda dos Alimentos que exprime valores de 18 %, 20 % e 23 % para os grupos de alimentos referidos, respetivamente.

Um bom ponto de partida para solucionar esta questão seria começar pelo aproveitamento e transformação dos produtos alimentares desperdiçados (apesar de terem qualidade) como são exemplo o excedente de soro de leite de cabra e dos morangos cujos padrões de calibre e/ou estética não permitem a sua comercialização no estado fresco; sendo que, na maior parte das situações, estes dois produtos acabam mesmo no lixo ou espalhados pelo meio ambiente, contribuindo não só para o desperdício alimentar como também para o aumento da poluição e consumo desnecessário de recursos naturais (Instituto Nacional de Estatítica, 2017).

III.A- O soro de leite de cabra

"Leite de cabra, queijo de ovelha e *manteiga de vaca",* este aforismo popular muito utilizado pelos mais velhos, sobretudo na região interior do nosso país, representa muito bem o conhecimento empírico que se tem sobre os diversos tipos de leite e que, ao longo dos tempos, a ciência veio explicar de forma exata.

Vivemos tempos em que a procura por alimentos mais saudáveis e sustentáveis é uma tónica constante e o leite de cabra e derivados são bons exemplos de produtos outrora muito utilizados que caíram em desuso e começam agora a ser novamente valorizados.

O leite de cabra foi o terceiro mais produzido a nível mundial correspondendo a cerca de 17 milhões de toneladas, o equivalente a 2,4 % da produção mundial de leite (Fernandes, 2013).

Em alguns países desenvolvidos existe já um verdadeiro mercado de procura em relação a este tipo de leite bem como em relação aos produtos que dele podem derivar. Tal facto, está diretamente relacionado com o potencial nutricional associado ao leite de cabra. Por outro lado, é de salientar, que o aumento de produção deste tipo de leite poderia servir de alavanca para o desenvolvimento de algumas regiões em que predominam não só a caprinicultura como também o tratamento e transformação do leite de cabra para a obtenção de queijo.

A composição do leite pode variar em função de alguns importantes fatores que englobam a espécie, a raça, o estádio de lactação e a variação durante o período da ordenha do animal. Na tabela II adaptada de (Gantner, 2015), e de forma sucinta, apresentam-se as composições químicas dos leites de cabra e vaca.

Leite	Matéria Seca (g/100 g)	Matéria Gorda (g/100 g)	Proteína (g/100 g)	Lactose (g/100 g)	Cinzas (g/100 g)	Energia (Kj/100 g)
Vaca	12,0-13,0	3,3-6,4	3,0-4,0	4,4-5,6	0,7-0,9	270-280
Cabra	12,0-16,0	3,0-7,2	3,0-5,2	3,2-4,5	0,7-0,9	280-290

Tabela II- Características nutricionais dos leite de cabra e vaca adaptada de (Gantner, 2015).

Após observação e breve análise da tabela supra, concluiu-se que o consumo do leite de cabra e derivados pode ser uma escolha bastante adequada no que diz respeito à manutenção de uma dieta saudável que inclui o aporte necessário de todos os nutrientes representados.

À exceção da percentagem de matéria gorda, o leite de cabra e o leite de vaca apresentam concentrações semelhantes em matéria seca, proteína, cinzas e energia. Apesar do teor de matéria gorda mais elevado, o leite de cabra possui, sob o ponto de vista nutricional, moléculas de gordura de maior qualidade. Isto é, a composição em ácidos gordos do leite de cabra traduz-se numa maior concentração de moléculas de ácido linoleico e ácido linolénico, ómega-6 e ómega-3 respetivamente. Estes são ácidos gordos essenciais e exercem funções de extrema importância ao nível do desenvolvimento e manutenção do córtex cerebral (ácido linolénico), bem como no auxílio ao funcionamento do sistema cardiovascular (ácido linoleico). De entre as espécies ruminantes vaca, ovelha e cabra, sabe-se que o leite de origem caprina é aquela cuja concentração em ácidos gordos essenciais é a mais elevada (Gantner, 2015). Realça-se ainda o menor conteúdo em lactose, que revela especial importância para aqueles que sofrem de intolerância alimentar a esse composto.

Acrescenta-se que à exceção da vitamina C, o leite de cabra apresenta uma concentração superior em vitaminas A, B1, B12 e D face aos leites de vaca e ovelha. Destaca-se ainda o seu conteúdo mineral muito semelhante aos demais (leite de vaca e ovelha), com

especial relevância para o fósforo, cuja percentagem por 100 g é mais elevada estando entre 0,2 % e 0,3 % (Fernandes, 2013).

Assim, os produtos derivados de leite de cabra como é exemplo o soro, podem entrar num nicho pouco explorado de mercado na indústria dos lacticínios, nicho esse que procura alternativas ao consumo do leite e iogurtes de vaca e que tem uma especial preocupação em consumir alimentos de qualidade, segurança e composição nutricional distintos.

O soro de leite é o produto excedente do fabrico de queijo e por isso é o principal subproduto/resíduo que resulta da indústria dos lacticínios. Trata-se de um líquido amarelo que se forma após a coagulação do queijo e que representa entre 85 % a 95 % do volume total de leite utilizado para o fabrico de queijo (Fernandes, 2013).

No ano de 2016, registou-se um aumento de 5,1 % no consumo de queijo o que fez disparar a produção de soro de leite. A produção total de queijo atingiu, neste mesmo ano, um total de 83 mil toneladas, sendo que 2,9 mil toneladas corresponderam à produção do queijo de cabra (INE, 2017).

Sabe-se que para produzir 1 kg de queijo de cabra são necessários 9 litros de leite e que durante este processo se formam aproximadamente 8 litros de soro (DGAV, 2011).

Assim, a produção de soro de leite de cabra é muito significativa, tendo sido produzidos no ano de 2016, cerca de 33 mil toneladas de soro. Apesar de ser um produto nutricionalmente completo, quando tratado como resíduo e despejado em ETAR própria (Estação de Tratamento de Águas Residuais), nas instalações das queijarias, ou no solo e cursos de água, acarreta enormes consequências para o meio ambiente, pois trata-se de um efluente de elevada carga orgânica e por isso de difícil biodegradação.

Quando presente em cursos de água, desencadeia fenómenos de eutrofização que culminam, muitas vezes, na mortandade das espécies presentes em rios e lagos. Neste ponto é crítico que se sublinhe o facto de que 62 % das queijarias nacionais têm permissão legal para fazer as descargas de soro e outros efluentes residuais (após devido tratamento), que resultem do seu normal funcionamento, para linhas de água próximas (Guerreiro *et al.*, 2015).

A carga poluente do soro de leite é tão preocupante e o volume deste subproduto que chega ao meio ambiente é tão elevado que se devem arranjar soluções para o seu devido processamento e valorização. Acrescenta-se ainda que no presente, para a maioria das indústrias deste setor, o soro não é mais do que um custo sem retorno e que exige medidas reais para que seja aproveitado e valorizado economicamente.

III.B- Os morangos

Os morangos são comumente inseridos no grupo dos frutos vermelhos, mas a sua designação taxonómica permite-nos saber que este fruto faz parte da família *Rosaceae* e a designação científica correta para a planta herbácea que dá origem ao fruto é *Fragaria vesca.*

O morangueiro e o seu fruto são produzidos e muito apreciados em várias regiões do mundo, contudo a cultura desta espécie é mais predominante nas regiões do Hemisfério Norte com clima temperado a mediterrânico.

De acordo com os dados disponibilizados pela FAO, a produção mundial deste fruto é dominada por um conjunto de 13 países que representa cerca de 85 % do total de morangos produzidos a nível mundial.

Em primeiro lugar, encontram-se os EUA (Estados Unidas da América) com uma produção de morangos muito acima de qualquer outro país com mais de 1 milhão de toneladas anuais, seguindo-se a Espanha com 500 mil toneladas de morango produzido por ano. Relativamente a Portugal e segundo dados da FAO, são cultivadas, anualmente, pouco mais de 12 mil toneladas; um número que tem vindo a aumentar ao longo dos últimos 10 anos, mas que, ainda assim, é baixo quando comparado com o país vizinho (FAO, 2015).

Em Portugal, o morango é produzido praticamente durante todo o ano e as principais zonas de cultivo situam-se na região Oeste e Ribatejana que representam entre 50 % a 60 % da área nacional cultivada com esta espécie. Apesar de disponível o ano inteiro, existe um período de maior oferta na Primavera, de abril a julho, um período de média oferta de fevereiro a março e à época outonal corresponde o período de menor oferta (Palha, 2005).

No setor dos produtos hortícolas, apesar de serem escassos os dados relativamente ao morango, sabe-se que em Portugal cerca de 17 % dos produtos são deitados fora, o que equivale a 1 milhão de toneladas de alimentos.

A questão mais preocupante que se levanta, quando se analisam estes dados, é que estes produtos que não são aproveitados, não se traduzem em comida imprópria para consumo, mas sim a frutas e legumes que pelo seu calibre, forma, tamanho ou cor não podem ser comercializados em condições frescas e de "ótima qualidade" (Pereira, 2014).

Este enorme desperdício é, em grande parte, suportado pela legislação portuguesa e europeia que se encontram em vigor. Estas normas estabelecem os "parâmetros ideais" como o peso mínimo e máximo, cor e calibre para a comercialização das frutas que são colhidas pelos produtores, que, no caso de não respeitarem a norma expressa no Regulamento CE n.º 1234/2007 do Conselho, de 22 de outubro de 2007 não chegam aos supermercados (União Europeia, 2007).

No caso dos morangos, acresce a este conjunto de regras, um outro regulamento, que estabelece normas específicas de comercialização para 10 produtos (maçãs, citrinos, kiwis, alfaces, pêssegos e nectarinas, peras, morangos, pimentos, uvas e tomates), ou seja, para que estes se definam ou não como possíveis para comercialização é necessário que cumpram o estabelecido tanto na norma geral (Regulamento CE n.° 1234/2007 do Conselho, de 22 de outubro de 2007), como na específica (Regulamento de Execução (UE) n.° 543/2011 da Comissão, de 7 de Junho de 2011) o que aumenta o número de unidades que não cumprem estes requisitos, aumentando forçosamente o desperdício alimentar para a categoria do morango (União Europeia, 2011).

Com base no descrito, torna-se evidente que são necessários estudos para que se diminuam as perdas no setor hortofrutícola, pois os números face ao desperdício alimentar nesta área são alarmantes e levantam questões quer do ponto de vista económico para os produtores, quer do ponto de vista ético para a sociedade em geral.

Falar em desperdício alimentar por questões de estética, é reprovável, numa altura em que é necessário aumentar a produção de alimentos, para que se consigam alimentar as gerações futuras (FAO, 2009).

Tendo como referência todo enquadramento exposto anteriormente, torna-se bastante evidente o objetivo deste trabalho:

- Reaproveitar o soro proveniente da produção do queijo de cabra e os morangos não comercializáveis a fresco por questões de calibre ou estética, transformando-os num novo produto alimentar que do ponto de vista nutricional seja adequado e se insira numa dieta variada e saudável.

Pretende-se que este novo produto alimentar seja inovador e sustentável, permitindo, em simultâneo, valorizar o setor primário e secundário, nomeadamente a indústria queijeira e a agricultura nacionais.

Este trabalho pode então ser um princípio para a criação de uma nova linha de produtos para o setor alimentar que tem potencial mercado, uma vez que se enquadra nas novas tendências para uma alimentação saudável, sustentável e segura.

Capítulo IV

Desenvolvimento do novo Produto Alimentar através de Subprodutos da Indústria

Um dos objetivos deste trabalho passa pelo desenvolvimento de uma bebida à base de soro de leite de cabra e morangos não vendáveis em fresco de modo a que se valorizem estes dois subprodutos da indústria (cf. já explanado).

Desta forma, foi elaborada uma "*receita*" para uma nova bebida fermentada agradável ao palato e cujo processo de produção é possível de reproduzir industrialmente.

IV.A- Constituintes Básicos da Bebida

- Soro de leite de cabra diafiltrado;
- Morangos congelados de variedade *San Andres;*
- Sacarose comercial;
- Mistura de bactérias para fermentação (*Lactobacillus* sp.*)*;
- Mistura de Probióticos CPR I (*Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus paracasei paracasei)*.

IV.B- Preparação dos ingredientes base- Soro de leite de Cabra e Morangos

Para o desenvolvimento da bebida, tanto o soro como os morangos foram sujeitos a uma série de etapas prévias.

A preparação do soro de leite de cabra começou com a recolha deste produto após a elaboração do queijo (refere-se que o soro de leite utilizado foi generosamente cedido pela empresa TéTé II-Produtos Lácteos e tratado nas instalações da Escola Superior Agrária de Coimbra – ESAC – Oficina Tecnológica de Lacticínios).

Após a sua receção nas instalações da ESAC, o soro sobrante da manufatura do queijo de cabra foi então sujeito a um tratamento de conservação através do aquecimento-pasteurização. O soro de leite foi aquecido a uma temperatura de cerca de 73 °C durante um período de 50 segundos. O objetivo deste método térmico passa por tornar o produto seguro

para consumo e aumentar o seu prazo de validade através da eliminação dos microrganismos (Li *et al.*, 2018).

Imediatamente antes do processo de pasteurização, o soro de leite de cabra foi sujeito a um processo de desnate. Este método tem como propósito a eliminação da matéria gorda presente e é uma etapa crucial, não só porque torna o soro de leite num produto do ponto de vista nutricional mais saudável através da diminuição da quantidade de lípidos, como também permite a continuidade do processo de tratamento do soro para obtenção da fração proteica de interesse, pois os glóbulos de matéria gorda, devido ao seu elevado tamanho, impedem que se separem os vários constituintes do soro através das membranas da ultrafiltração, obstruindo-as.

O soro foi então introduzido numa centrífuga industrial (figura VI), comumente designada de desnatadeira onde ocorre a separação da gordura dos restantes constituintes; esta separação acontece através da diferença de densidades das partículas.

No final deste processo obteve-se então o soro de leite de cabra desnatado.

Figura VI- Unidade de pasteurização acoplada a centrífuga industrial (desnatadeira).

Com o objetivo de isolar o concentrado de proteínas (fração de interesse para a formulação da nova bebida) do soro, recorreu-se ao um processo de Ultrafiltração (UF) através de membrana de 10 kDa de limiar de corte (modelo 10K3838-30) com 5,5m^2 de área filtrante instalada numa unidade piloto de UF (Proquiga-Espanha) (Figura VIII). Esta técnica utiliza uma barreira física, sob a forma de membrana porosa ou filtro, para separar as partículas de um fluido (neste caso: soro de leite de cabra desnatado) de acordo com o seu tamanho e forma. De referir, que para que ocorra a separação são utilizadas a força eletromotriz e a

diferença de pressão. Este processo permite que a água, os sais dissolvidos e a lactose passem pela membrana de ultrafiltração, enquanto que se retêm (e concentram) as proteínas do soro.

A separação devido à diferença de tamanho entre partículas por ação da diferença de pressão pode ser representada com recurso ao esquema que se segue na figura VII.

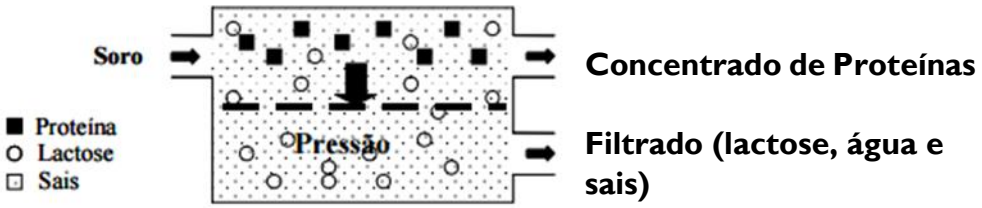


Figura VII- Esquema do processo de ultrafiltração adaptado de Hoffman C., 2003 (Hoffmann, 2003).

O fluxo começou com um débito de 36,4L/h/m^2, mas acabou por baixar até aos 23,64L/h/m^2, devido a fenómenos de colmatação da membrana. Dos 280,0 litros iniciais, foram obtidos 15,0 litros de retido de proteínas, o designado *Concentrado Líquido de Proteínas do Soro (CLPS)* e 265,0 litros de *Filtrado* (água, lactose e sais minerais).

O fator de concentração volumétrica (FCV) (Volume alimentação/Volume concentrado) foi assim de 18,66.

Figura VIII- Unidade piloto de ultrafiltração (Proquiga, Espanha).

Tendo em conta as características organoléticas do soro de leite de cabra, nomeadamente o cheiro e a concentração elevada de sal (proveniente do processo de manufatura do queijo curado de cabra), o CLPS teve de sofrer uma diluição em água para possibilitar uma nova ultrafiltração, pois era necessário otimizar as suas características organoléticas para que se pudesse preparar uma bebida adequada ao consumo e agradável ao palato. Assim, os 15,0 litros obtidos foram separados em duas metades e a um dos volumes de 7,5 litros foram adicionados 120,0 litros de água, perfazendo-se um volume total de 127,5 litros. Este volume foi sujeito às mesmas características de ultrafiltração já mencionadas, obtendo-se 10 litros de CLPS (FCV=127,5/10=12,75), desta feita diafiltrado e 117,5 litros de água, sais e lactose que foram rejeitados devido à enorme concentração de cloreto de sódio.

O processo de tratamento ficou concluído com a divisão e congelação a -6 °C do CLPS diafiltrado em garrafas de 2 Litros.

A figura IX representa um fluxograma de todas as etapas (desde a colheita e receção do soro de leite após a manufatura do queijo curado de cabra, até à obtenção do concentrado líquido de proteínas do soro – CLPS – diafiltrado).

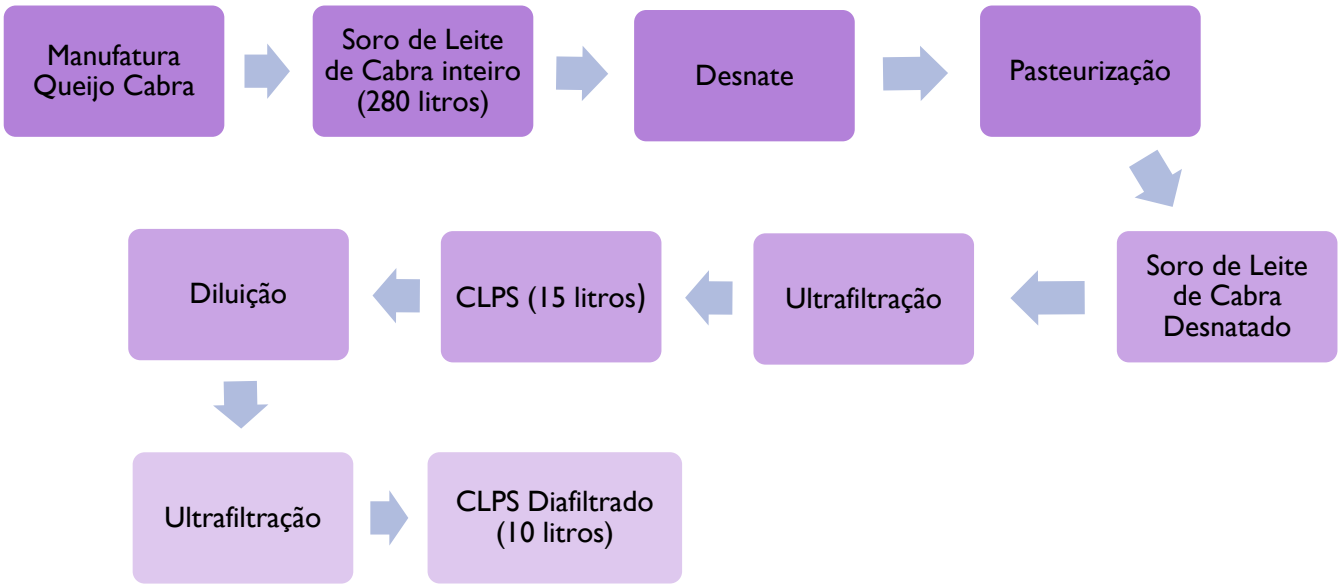


Figura IX- Fluxograma da metodologia de obtenção do CLPS.

De modo a otimizar as características nutricionais da nova bebida, bem como as suas qualidades organoléticas e prazo de validade, o concentrado de proteínas diafiltrado foi alvo de fermentação.

Adotou-se um processo fermentativo semelhante ao de um iogurte líquido, sendo que foram ainda acrescentados microrganismos probióticos à mistura. Assim, a 200,0 ml de CLPS (após descongelação), foram adicionadas 3,0 mg de microrganismos fermentadores *Lactobacillus* sp. e microrganismos da mistura de probióticos CPR1.

O produto resultante desta mistura foi incubado em estufa a 40 ° C durante 12 horas. A confirmação de que o processo fermentativo decorreu de forma correta era executada através da medição do pH após o tempo de incubação; este devia situar-se entre os 4,00 e 5,00.

A imagem abaixo diz respeito ao aspeto do concentrado líquido proteico após fermentação, cujo pH era igual a 4,63.

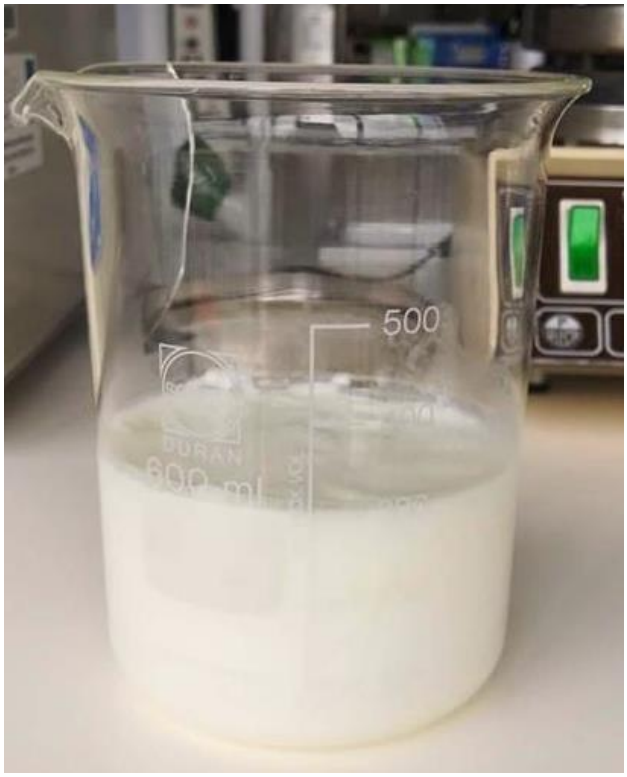


Figura X- Concentrado de proteínas do soro de leite de cabra após fermentação.

Concluído o processo de tratamento e preparação do concentrado de proteínas de soro de leite de cabra, procedeu-se ao tratamento dos morangos para obtenção da polpa de fruta que em conjunto com o concentrado proteico deram origem à bebida final (refere-se

que a fruta foi cedida pela empresa *Valmarques LDA*-Arazede, Montemor-o-Velho, na pessoa do Sr. José Marques que muito gentilmente se dispôs, desde o início deste trabalho, a participar e a auxiliar com os seus recursos).

Os morangos em questão eram da variedade *San Andres* (Figura XI) e de entre todas as peças de fruta disponíveis, as que mais interessavam para a elaboração das novas bebidas, eram aquelas que constituíam o grupo de morangos que não podia ser vendido fresco; estes são aqueles morangos que se encontram fora do calibre padronizado para venda, mas que ainda assim têm todas as caraterísticas nutricionais necessárias para que possam ser consumidos.

Figura XI- Morangos da Variedade *San Andre*s não comercializáveis em fresco.

Depois da colheita, as sépalas dos morangos foram cuidadosamente retiradas e as peças de fruta foram lavadas em água fria.

A seguir, foram forçadas a passar por uma corrente de ar comprimido de modo a retirar o excesso de água e possibilitar uma correta congelação, isto é, isenta de cristais de gelo que acabariam por danificar a fruta impedindo a sua utilização. Depois de devidamente acondicionados, os morangos foram então congelados a uma temperatura de -11°C.

A receita para a polpa de fruta é simples. Os morangos foram previamente descongelados e cortados e adicionada uma quantidade de sacarose equivalente a 5,0 % da bebida final. A mistura dos morangos com a sacarose repousou durante, aproximadamente,

30 minutos. A percentagem de sacarose utlizada foi determinada após várias tentativas e análises sensoriais que provaram que 5,0 % de sacarose é a quantidade mínima necessária para que a polpa de fruta disfarce suficientemente, o sabor intenso das proteínas do soro de leite de cabra.

Assim sendo, a bebida final é constituída por 65,0 % de CLPS, 30,0 % de fruta e 5,0 % de sacarose, ou seja, 35,0 % de polpa de fruta.

As várias preparações elaboradas no decorrer deste trabalho foram preparadas para um volume final de bebida de 200 ml. Pelo que, a 130 ml de produto fermentado adicionou-se 70 ml de polpa de morangos. Esta mistura foi colocada num copo misturador (PHILIPS HR 2064, Brasil) e triturada na velocidade máxima durante, aproximadamente, 4 a 5 minutos. A bebida final assemelha-se a um *Smoothie* de morango e é conservada com recurso a uma refrigeração correta de 4 °C. Na figura XII apresenta-se o aspeto final da bebida obtida.

Figura XII- Aspeto final da bebida obtida através CLPS de leite de cabra e polpa de morango.

Capítulo V

Materiais e Métodos para a caracterização do perfil nutricional e antioxidante da bebida formulada

Após a formulação da nova bebida à base de concentrado líquido de proteínas de soro de leite de cabra e polpa de morango feita com fruta não vendável a fresco, foi executada a caracterização do perfil nutricional e perfil antioxidante, pois uma vez que o processo de fabrico desta bebida é possível de extrapolar para a indústria, existe o interesse de comprovar que as características nutricionais se enquadram num produto saudável e seguro.

Para a caracterização do perfil nutricional foram executadas oito análises para determinar a:

- percentagem de proteína;
- percentagem da humidade;
- percentagem de sólidos totais e teor de cinza;
- percentagem de matéria gorda livre;
- percentagem de fósforo;
- determinação dos cloretos solúveis e fibra.

Quanto ao perfil antioxidante, este foi caracterizado de duas formas:

- em primeiro lugar fez-se a caracterização do teor em compostos fenólicos totais e flavonoides;

- em segundo lugar procedeu-se à caracterização da capacidade antioxidante da bebida e para tal utilizaram-se a análise da capacidade de inibição do radical DPPH e a análise do coeficiente de atividade antioxidante através do teste do branqueamento do β-Caroteno.

Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

1. Determinação da Percentagem de Proteína

Materiais e Reagentes

Kjeltec system 2020 digestor Herndon, VA, USA;

Aparelho de Mineralização;

Balança analítica AG285 Mettler Toledo (Lisboa, Portugal);

Pastilhas de Selénio;

Solução de Ácido Sulfúrico Concentrado;

Indicador Vermelho de Metilo;

Água destilada;

Solução de Ácido Sulfúrico 0,2 N;

Solução de Hidróxido de Sódio 0,2 N;

Solução Alcalinizante (1 Kg de NaOH + 75 g de Hipossulfito de sódio + 1500 ml de água destilada);

Solução de sacarose.

Procedimento

O método utilizado para a análise deste parâmetro foi o método de *Kjeldahl* descrito na NP 590 (2009) ao qual se fizeram algumas adaptações.

Esta metodologia analítica caracteriza-se como uma metodologia indireta para a determinação de proteína, uma vez que, se baseia na determinação do conteúdo total de azoto presente na amostra, quer seja ele azoto proteico (isto é que faz parte da constituição das proteínas), quer seja azoto não proteico (Mæhre *et al.*, 2018).

Desta forma, para que se converta o conteúdo em azoto, em percentagem de proteína é utilizado um fator de conversão (6,25) que tem como princípio que em cada grama de proteína, existem em média 0,16 g de azoto (Sáez-Plaza, *et al.*, 2013). Este é apenas um fator de conversão médio, pois a percentagem de azoto presente em cada proteína depende do tipo de aminoácidos que fazem parte da sua constituição.

O método de *Kjeldahl* é composto por três fases: mineralização ou digestão, destilação e titulação ácido-base.

Na primeira etapa que ocorre no aparelho mineralizador, o que se pretende é libertar todas as moléculas de azoto presentes na amostra utilizando-se um ácido e catalisador (que

acelera a reação). Esta etapa decorre até que toda a digestão da matéria orgânica esteja completa e o azoto orgânico seja transformado em azoto mineral na forma de amoníaco. No final deste processo a amostra contida no tubo de mineralização deve ficar incolor.

A etapa de mineralização começou com a medição rigorosa de (0,500±0,001) g de amostra para o tubo de mineralização. Adicionou-se uma pastilha de selénio (catalisador) e 25,0 mL de ácido sulfúrico A reação de digestão ocorreu durante 40 minutos no aparelho a uma temperatura de 420 °C. Após arrefecimento adicionou-se à mistura 75,0 mL de água destilada.

Na segunda fase, destilação, o que se pretende é arrastar o amoníaco através do vapor de água de modo a que este seja libertado num matraz que contém, um volume de concentração conhecida de ácido sulfúrico.

No aparelho de *Kjeltec* fez-se a dispensa de 50,0 mL de solução alcalinizante (que permite a libertação do azoto) para o tubo de mineralização e colocou-se nesse mesmo aparelho um matraz com 25,0 mL da solução de ácido sulfúrico 0,2 N e 3 gotas de vermelho de metilo (indicador). Iniciou-se o processo de destilação que se deu por terminado quando se recuperaram 150,0 mL de solução no matraz.

A última fase é a da titulação ácido-base. A solução de hidróxido de sódio 0,2 N foi utilizada como titulante. A titulação ocorreu até ao ponto de viragem do indicador para amarelo- Volume gasto de titulante para titular a amostra **(V1).**

Paralelamente, executou-se o ensaio em branco. Este ensaio é um tudo semelhante ao que se executou para a amostra, contudo esta é substituída por uma solução de sacarose obtida através da pesagem rigorosa de (0,500±0,001) g desse composto.

Da titulação da solução final obtida do ensaio em branco vem o volume gasto de titulante para titular o branco **(V2).**

A percentagem de proteína obtém-se através da aplicação da fórmula a baixo:

$$\% \text{ Proteína} = \frac{(\boldsymbol{V2} - \boldsymbol{V1}) \times 0{,}28 \times 6{,}38}{M}$$

V1- Volume, em mL, de Titulante Dispensado no Ensaio da Amostra

V2- Volume, em mL, de Titulante Dispensado no Ensaio em Branco

M- Massa da toma de Amostra em gramas

0,28- Fator de que relaciona o número de moles de NaOH com as moléculas de azoto libertado

6,38- Fator de conversão específico para derivados do leite (equivalente a 0,16 g de azoto por grama de proteína).

2. Determinação da Percentagem de Humidade

Materiais e Reagentes

Cápsula de fundo plano (7 cm de diâmetro) e vareta;

Areia calcinada;

Estufa regulável;

Exsicador;

Balança analítica AG285 Mettler Toledo (Lisboa, Portugal).

Procedimento

O método utilizado para a determinação de humidade, foi o método da perda de peso por aquecimento. Trata-se de uma adaptação do descrito na NP 1612 (2002) para produtos húmidos. Colocou-se uma cápsula com areia calcinada e uma vareta em estufa previamente aquecida a (100±2) °C durante duas horas. Após secagem, o conjunto foi transferido para o exsicador para arrefecer e, por fim, efetua-se a determinação da massa (Massa Cápsula Vazia). Seguidamente, pesou-se rigorosamente (5,000±0,001) g de amostra para a cápsula que continha areia e a vareta e colocou-se este conjunto na estufa a (100±2) °C por uma hora. Por fim, põe-se o conjunto no exsicador para arrefecer.

A amostra foi submetida a ciclos de secagem em estufa, arrefecimento em exsicador e pesagem, até peso constante (Massa cápsula após Aquecimento) (Fernandes *et al.*, 2007).

O cálculo da percentagem de Humidade é efetuado através da seguinte equação:

$$\%\ Humidade = \frac{Massa\ Cápsula\ após\ Aquecimento - Massa\ Cápsula\ Vazia}{Massa\ Amostra} \times 100$$

3. Determinação da Percentagem de Sólidos Totais

A partir dos resultados obtidos no ensaio anterior, facilmente se determinou a percentagem de sólidos totais das amostras o que está também de acordo com o descrito com a NP 1612 (2002).

A equação seguinte permite então o cálculo desta percentagem:

$$\%\, Sólidos\ Totais = 100 - \%\, Humidade$$

4. Determinação do Teor de Cinzas

Materiais e Reagentes

Balança analítica AG285 Mettler Toledo (Lisboa, Portugal);

Cápsula de porcelana (20,0 cm^2 de superfície e 2,5 cm de altura);

Mufla regulável;

Placa elétrica de aquecimento estufa regulável;

Exsicador.

Procedimento

De acordo com a NP 1615 (2002), entende-se como teor de cinza total o resíduo proveniente da inceneração da amostra a uma temperatura de 550 °C expresso em percentagem da massa total de amostra.

Começou por se colocar a cápsula na mufla durante aproximadamente meia hora, retirou-se a cápsula calcinada e colocou-se no exsicador até arrefecer. Seguidamente pesou-se a massa da cápsula (Massa Cápsula Vazia).

Pesaram-se rigorosamente (2,000±0,001) g de amostra para a cápsula e levou-se a mesma à placa elétrica de aquecimento até que toda a amostra carbonizasse. Por fim, transferiu-se a cápsula com a amostra carbonizada para a mufla previamente aquecida a (550±20) °C na qual permanece durante 3 horas. Decorrido este período de tempo, a cinza encontrava-se totalmente clara e por isso a cápsula pôde passar para o exsicador; aqui permaneceu até estar à temperatura ambiente. A cápsula foi então pesada (Massa da Cápsula após incineração).

O cálculo do teor de cinzas total pode ser realizado através da seguinte equação:

$$\text{Teor de Cinzas} = \frac{Massa\ Cápsula\ após\ Inceneração - Massa\ cápsula\ Vazia}{Massa\ Amostra} \times 100$$

5. Determinação da Percentagem de Matéria Gorda Livre

Materiais e Reagentes

Aparelho de extração *de Soxhlet;*

Balança analítica AG285 Mettler Toledo (Lisboa, Portugal);

Banho de areia;

Cápsula de porcelana (20 cm^2 de superfície e 2,5 cm de altura);

Cartucho;

Estufa regulável;

Exsicador;

Éter de petróleo;

Sulfato de sódio anidro.

Procedimento

A técnica escolhida para a determinação da matéria gorda livre está de acordo com a NP 1224 tendo-se procedido a algumas alterações. Assim, entende-se por gordura livre a fração de amostra extraída por um solvente orgânico num extrator de *Soxhlet* (Jensen, 2007).

Para esta técnica, a toma de amostra utilizada foi aquela se obteve da determinação da humidade, pois já se encontrava completamente seca. Da toma de amostra já obtida, pesaram-se então rigorosamente (3,000±0.001) g (Massa Amostra). Previamente, o balão do aparelho de extração é colocado na estufa a (103±2) °C durante uma hora. De seguida é transferindo para o exsicador até atingir a temperatura ambiente e faz-se a medição da sua massa (Massa dos Balões Vazios).

A toma de amostra pesada foi colocada no cartucho de extração com o auxílio de algodão humedecido em éter de petróleo e o cartucho é transferido para o aparelho de extração.

No balão do aparelho de extração já pesado, deita-se um volume de éter de petróleo igual a duas vezes a capacidade da alonga do aparelho.

O balão foi acoplado ao aparelho de extração e aquecido até ebulição, 65 ° C, durante 4 a 5 horas. Terminada a extração elimina-se o excesso de éter por destilação.

Secou-se o balão em estufa a (103±2) °C durante uma hora, arrefeceu-se no exsicador e mediu-se a massa do balão (Massa do Balão + Amostra após Secagem).

O teor de gordura livre foi calculado recorrendo à equação que a seguir se mostra:

$$\% \text{ Matéria Gorda Livre} = \frac{Massa\ do\ Balão + Amostra\ após\ Secagem - Massa\ Balão\ Vazio}{Massa\ Amostra} \times 100$$

6. Determinação da Percentagem de Fósforo

Materiais e Reagentes

Balança analítica AG285 Mettler Toledo (Lisboa, Portugal);

Espectrofotómetro U-3900 da Hitachi (Tóquio, Japão) com *software* U.V Solutions 3.0;

Ácido clorídrico concentrado;

Água destilada;

Ácido molíbdico;

Solução de sulfato ferrosoc;

Ácido sulfúrico concentrado;

Solução Padrão de fósforo (20,0 µg/mL).

Procedimento

Este ensaio foi adaptado da NP 1842-1 (2008), que descreve o método que permite determinar a percentagem de fósforo por espectrofotometria.

A toma de amostra da qual se partiu foi o resíduo que se obteve do ensaio para o cálculo do teor de cinzas.

O procedimento começou com a introdução de 10,0 mL de ácido clorídrico no cadinho das cinzas o qual se levou à fervura durante 5 minutos em placa de aquecimento. Depois de esta mistura arrefecer, passou-se o líquido para um balão aferido de 100,0 mL e completou-

se o seu volume com água destilada. Filtrou-se este preparado para um balão Erlenmeyer. Daqui retiraram-se 10,0 mL que se diluíram num balão de 100,0 mL com água destilada.

Preparou-se uma solução de sulfato ferroso. Para um balão de 50,0 mL pesaram-se de forma rigorosa (2,000±0.001) g de sulfato ferroso hepta-hidratado e adicionaram-se 20,0 ml de água destilada, bem como 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

Para a preparação da solução a analisar, retirou-se 1,0 mL da solução das cinzas para um tubo de ensaio; adicionaram-se 9,0 mL de ácido molíbdico e 0,8 mL de solução de sulfato ferroso previamente preparada.

O branco foi preparado com 1,0 mL de água destilada e com os restantes reagentes acima mencionados já utilizados na preparação da amostra. De igual modo preparou-se também uma solução padrão de fósforo de 20,0 μg/mL.

O cálculo da percentagem total de fósforo pode ser obtido através da aplicação da equação que se segue:

$$\%\,Fósforo = \frac{2\times(-\log Ta)}{m\times(-\log Tp)}$$

Ta- Transmitância da Amostra

Tp- Transmitância do Padrão

m- Massa do resíduo obtido no ensaio do Teor total de cinzas

7. Determinação da Percentagem de Cloretos Solúveis em Água

Materiais e Reagentes

Água destilada;

Carvão ativado;

Solução Carrez I [24 g de acetato de zinco [Zn [$(CH_3COO)_2.2H_2O$] + 3 g e ácido acético glacial (CH_3COOH) + água destliada];

Solução Carrez II [10,6 g de ferrocianeto de potássio [$K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$] + água destialada);

Ácido nítrico;

Solução de sulfato de ferro III e amónio ($NH_4Fe(SO_4)_2.12H_2O$);

Solução de nitrato de prata 0,1N;

Solução de tiocianato de potássio 0,1N;

Éter dietílico;

Agitador mecânico agitador horizontal HS 501D da IKA®-Labortechnik (Staufen, Alemanha);

Balança analítica AG285 Mettler Toledo (Lisboa, Portugal).

Procedimento

A técnica de determinação dos cloretos utilizada é baseada no método de Charpentier Volhard e teve-se como referência o descrito na NP 1845 (1982). Esta análise tem como base a extração a quente dos cloretos e a sua precipitação através do excesso de nitrato de prata.

De forma resumida, a preparação da amostra começou pela pesagem rigorosa de (5,000±0,001) g de amostra que se introduziram num balão volumétrico de 500,0 mL. Adicionou-se cerca de 1 g de carvão ativado, 400,0 mL de água destilada, 5,0 mL de solução Carrez I e 5,0 mL de Solução Carrez II. Durante 30 minutos a mistura foi colocada no agitador mecânico. Por fim, completou-se o volume com água destilada, homogeneizou-se e filtrou-se, obtendo-se o filtrado que se utiliza para o processo de titulação.

Para a titulação, mediu-se 25,0 mL do filtrado obtido anteriormente aos quais se adicionaram 25,0 mL de água destilada, 5,0 mL de ácido nítrico e 2,0 mL de solução saturada de ferro III e amónio. De seguida mediram-se 20,0 mL de solução de nitrato de prata 0,1 N e 5,0 mL de éter de dietílico que se juntaram à mistura anteriormente descrita.

Agitou-se vigorosamente para que ocorresse a aglutinação do precipitado de nitrato de prata.

Titulou-se o excesso de nitrato de prata com uma solução de tiocianato de potássio até que persistisse uma cor vermelha-acastanhada.

Executou-se paralelamente um ensaio em branco idêntico ao descrito em que o volume de amostra é substituído por água destilada.

A percentagem de cloretos, sob forma de NaCl é expressa através da fórmula seguinte:

$$\%NaCl=\frac{50\times5,854\times(Vb-V)}{Ve\times m}$$

Vb- Volume, expresso em ml, de KSCN que corresponde à solução nitrato de prata que foi deduzido no volume dispensado para titular o ensaio em branco;

V- Volume de titulante, tiocianato de potássio, expresso em ml, dispensado em cada ensaio real;

Ve- Volume de solução tomado para ensaio (25,0 mL);

m- massa de amostra;

50×5,854-fator que permite relacionar o volume de nitrato de prata que reagiu com ião cloreto (Vb-V) e os gramas de NaCl presentes em 100 g de amostra.

8. Determinação da Percentagem de Fibra

Materiais e Reagentes

Fibertec;

Cápsula de porcelana (20 cm^2 de superfície e 2,5 cm de altura);

Estufa regulável;

Mufla regulável;

Balança analítica AG285 Mettler Toledo (Lisboa, Portugal);

Ácido sulfúrico 0,26 N;

Hidróxido de sódio 0,32 N;

Água destilada.

Procedimento

O método escolhido para a caracterização da percentagem de fibra neste trabalho foi o método de *Weende*, previamente adaptado de modo a permitir a utilização do aparelho *Fibertec*.

Esta é uma técnica gravimétrica que consiste na digestão ácida da amostra com ácido sulfúrico.

A fibra bruta (ou alimentar), diz respeito ao conjunto de macromoléculas de origem vegetal que não são digeríveis pelas enzimas digestivas do Homem, uma vez que não são atacadas pelos sucos digestivos, contudo intervêm no processo da digestão. A fibra alimentar subdivide-se em duas categorias: a fibra insolúvel e a fibra solúvel. A fibra solúvel é parte integrante de frutos, vegetais, leguminosas, aveia, cevada e centeio, enquanto que a insolúvel é característica de cereais como o trigo e está por isso muito presente em alimentos integrais. Quimicamente, do grupo das fibras insolúveis fazem parte a celulose, hemicelulose e a lenhinha. Por seu turno, no grupo das solúveis encontram-se os polissacáridos não celulósicos, como as pectinas, gomas e as mucilagens (Mineiro, 2014).

Pesou-se uma alíquota (1,000±0,001) g de amostra seca e desengordurada (que resultou da técnica para a determinação da percentagem de matéria gorda livre) para um cadinho. Este foi acoplado no aparelho e foram adicionados no tubo de digestão 100,0 mL de ácido sulfúrico 0,26 N fervente que atuaram durante 30 minutos, sendo que a temperatura do tubo se encontra a 100 ° C. Terminado esse tempo a amostra é filtrada e lavada em vácuo com água destilada fervente 3 vezes consecutivas.

Ao resíduo que resultou da digestão ácida, é adicionado hidróxido de sódio 0,32 N fervente (100,0 mL) que permanece no tubo durante mais 30 minutos.

Seguidamente, a amostra é novamente lavada em vácuo com água destilada fervente 3 vezes consecutivas. Depois da última lavagem desliga-se o aparelho e transferem-se os cadinhos para a estufa previamente aquecida a (103±2) °C onde permanece durante a noite.

Mediu-se a massa do cadinho após estar no exsicador até arrefecer (Massa da cápsula com resíduo após secagem). Por fim, o cadinho foi levado à mufla a (550±20) °C durante uma hora ou até à obtenção de cinzas brancas (Massa Cápsula com resíduo após inceneração).

O cálculo que permite chegar à percentagem de fibra bruta é dado pela utilização da seguinte equação:

$$\%\ Fibra\ Bruta = \frac{(m1 - m2) \times 100}{m}$$

m1- Massa da cápsula, em gramas, com resíduo após secagem em estufa;

m2- Massa da cápsula, em gramas, com cinzas após inceneração;

m- massa, em gramas, de toma para amostra.

V.b- Caracterização do Perfil e Capacidade Antioxidante da bebida

1. Preparação e Extração dos compostos Antioxidantes da Amostra

Materiais e Reagente

Etanol absoluto;

Metanol;

Balança analítica AG285 Mettler Toledo (Lisboa, Portugal);

Agitador mecânico horizontal HS 501D da IKA®-Labortechnik (Staufen, Alemanha);

Centrífuga (modelo 3-16K da SIGMA Laborzentrifugen GmbH- Osterode, Alemanha);

Evaporador Rotativo (RE-111 da BÜCHI-Flawil, Suíça).

Procedimento

Depois de preparada a amostra de bebida de acordo com a "receita" descrita no capítulo anterior, procedeu-se então à extração dos compostos de interesse. Começou por se pesar rigorosamente (5,000±0.001) g de amostra às quais foram adicionados 50,0 mL de etanol absoluto. A mistura esteve em agitação constante (agitador mecânico horizontal) durante 30 minutos a 440 rpm. Terminado o período de agitação, foi transferida para um tubo de centrífuga e foi sujeita, durante 15 minutos, a centrifugação a uma velocidade e temperatura de 5000 *g* e 15°C, respetivamente. O sobrenadante obtido foi retirado para um balão periforme e sujeito a evaporação rotativa para que todo o solvente extrator fosse eliminado, sendo que a temperatura de evaporação se encontrava entre os 35 °C e os 40 °C.

Do produto seco obtido, com o auxílio de uma espátula retiraram-se 30 mg para um balão volumétrico de capacidade igual a 10,0 mL. Perfez-se o volume do balão com metanol e agitou-se manualmente até que todo o produto seco se dissolvesse, obtendo-se assim uma solução de amostra para análise de concentração igual a 3 mg/mL.

Todo este procedimento foi repetido em triplicado. Obteve-se, então, três soluções de extrato de concentração igual a 3 mg/mL Estas foram armazenadas no frio e envoltas em papel de alumínio para que estivessem sempre protegidas da luz durante o tempo em que fossem utilizadas para este projeto de dissertação.

2. Determinação do Teor em compostos Fenólicos Totais

Materiais e Reagente

Reagente Folin & Ciocalteu`s;

Metanol;

Carbonato de sódio;

Ácido gálico;

Balança analítica AG285 Mettler Toledo (Lisboa, Portugal);

Espectrofotómetro U-3900 da Hitachi (Tóquio, Japão) com *software* U.V Solutions 3.0.

Procedimento

Começou-se por preparar as soluções de Folin e carbonato de sódio. Diluíram-se 50,0 mL de reagente de *Folin & Ciocalteu`s* em 500,0 mL de água ultrapura e (30,000±0.001) g de carbonato de sódio em 500,0 mL de água ultrapura. A 7,5 mL de reagente de Folin diluído, adicionou-se 1,0 mL de solução de extrato, aguardou-se 5 minutos e por último acrescentou-se 7,5 mL de solução de carbonato de sódio. A mistura final foi conservada no escuro durante 120 minutos.

A presença de compostos fenólicos foi comprovada pela mudança de cor amarela da solução inicial para um tom azul, no final de decorrido o tempo de reação. Terminado esse tempo, a absorvância foi medida a um comprimento de onda de 725 nm.

O procedimento foi repetido em triplicado e o branco utilizado foi água.

Para a preparação de curva de calibração Concentração de Ácido Gálico (mg/mL) vs. Absorvância foram preparadas soluções de várias concentrações a partir de uma solução-mãe de Ácido Gálico (5 mg/mL). A concentração das 8 soluções que se fizeram para a construção da curva variou entre os 0,025 mg/mL e os 0,500 mg/mL tendo sido utilizado o comprimento de onda já mencionado para fazer as leituras de absorvância.

Por interpolação da curva de calibração foi então possível determinar o conteúdo da amostra em Fenólicos Totais expresso em equivalentes de Ácido Gálico por grama de amostra (GAE/g).

O método adaptado para esta determinação está de acordo com o descrito por (Erkan, *et al.* 2008).

3. Determinação do Teor em Flavonoides

Materiais e Reagente

Nitrito de sódio 5 % p/v;

Cloreto de alumínio;

Hidróxido de sódio;

Metanol;

Epicatequina [(-)-epicatequina (≥90 %)];

Água ultrapura;

Água destilada;

Balança analítica AG285 Mettler Toledo (Lisboa, Portugal);

Espectrofotómetro U-3900 da Hitachi (Tóquio, Japão) com software U.V Solutions 3.0.

Procedimento

Antes de se iniciar o procedimento analítico, prepararam-se as soluções necessárias à sua execução: começou por se preparar a solução de nitrito de sódio pesando-se (5,000±0.001) g de nitrito de sódio que se dissolveram em 100,0 mL de água destilada; para a solução de cloreto de alumínio dissolveram-se (10,000±0.001) g de cloreto de alumínio em 100,0 ml de água destilada e por último obteve-se a solução de hidróxido de sódio pesando-se (4,000±0.001) g de hidróxido de sódio que se dissolveram em 100,0 mL água destilada.

Dissolveu-se 1,0 mL da amostra de extrato e 0,3 mL da solução nitrito de sódio em 4,0 ml de água ultrapura. Esperou-se 5 minutos e adicionaram-se 0,6 mL de cloreto de alumínio à mistura anteriormente preparada. Aguardou-se mais 6 minutos e juntaram-se 2,0 ml da solução de hidróxido de sódio e 2,1 mL de água destilada.

Mediu-se a absorvância da mistura a um comprimento de onda de 510 nm, tendo sido utilizado como branco a água destilada.

Para a preparação da Curva de Calibração Concentração de Epicatequina (mg/ml) vs. Absorvância foram preparadas soluções de várias concentrações a partir de uma solução-mãe de epicatequina (1mg/mL) cujo solvente utilizado foi metanol. A concentração das 7 soluções que se fizeram para a construção da curva variou entre os 0,025 mg/mL e os 0,175 mg/mL tendo sido utilizado o comprimento de onda já mencionado para fazer as leituras de absorvância. Por interpolação da curva de calibração foi então possível determinar o conteúdo da amostra em flavonoides expresso em equivalentes de epicatequina por grama de amostra (ECE/g).

O método adaptado para esta determinação está de acordo com o descrito por (Yoo, K. M., *et al* 2008).

4. Determinação da Capacidade de Inibição do Radical DPPH

Materiais e Reagentes

Metanol;

Etanol;

Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2 carboxílico (Trolox);

Solução de Radicais DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil);

Balança analítica AG285 Mettler Toledo (Lisboa, Portugal);

Espectrofotómetro U-3900 da Hitachi (Tóquio, Japão) com *software* U.V Solutions 3.0.

Procedimento

Preparou-se uma solução metanólica de DPPH, tendo-se dissolvido 1,42 mg de solução de radicais DPPH em 100,0 mL de metanol.

A 50,0 µL de amostra de extrato, adicionaram-se 2,0 mL de solução metanólica de DPPH. A reação ocorreu durante 30 minutos no escuro e, por fim, mediu-se a absorvância a um comprimento de onda de 515 nm. Paralelamente, executou-se um ensaio controlo, que é um tudo semelhante ao que foi anteriormente descrito com a exceção de que não se utilizaram 50,0 µL de amostra, mas sim de etanol.

Para a preparação de Curva de Calibração Concentração de Trolox (mg/mL) *vs.* Absorvância foram preparadas soluções de várias concentrações a partir de uma solução-mãe de Trolox (0,5 mg/mL) cujo solvente foi metanol. A concentração das 6 soluções que se fizeram para a construção da curva variou entre 0,000 mg/mL e 0,200 mg/mL tendo sido utilizado o comprimento de onda já mencionado para fazer as leituras de absorvância.

Por interpolação da curva de calibração foi então possível determinar a capacidade de inibição dos radicais DPPH expressa em equivalentes de Trolox por grama de amostra (ET/g). O método adaptado para esta determinação está de acordo com o descrito por (Moure *et al.*, 2001).

5. Determinação do Coeficiente de Atividade Antioxidante- Teste do branqueamento do β-Caroteno

Materiais e Reagentes

Padrão β-caroteno;

Clorofórmio;

Ácido linoleico;

Tween 40;

Água ultrapura;

Metanol;

Evaporador Rotativo (RE-111 da BÜCHI-Flawil,Suíça);

Bloco de Aquecimento (SHT 1 da Stuart Scientific, Burlington, USA);

Balança analítica AG285 Mettler Toledo (Lisboa, Portugal);

Espectrofotómetro U-3900 da Hitachi (Tóquio, Japão) com software U.V Solutions 3.0.

Procedimento

Adicionaram-se 2 mg de β-caroteno em 10,0 mL de clorofórmio obtendo-se uma solução de concentração igual a 0,2 mg/ mL. Num balão de fundo redondo com capacidade igual a 250,0 mL juntaram-se 40 mg de ácido linoleico, 400 mg de Tween 40 e 2,0 mL da solução de β-caroteno anteriormente preparada. Esta mistura foi levada a evaporação no evaporador rotativo a 40 °C; terminada a evaporação adicionou-se ao produto seco 100,0 mL de água ultrapura que foi oxigenada durante o tempo de evaporação. Agitou-se vigorosamente a mistura obtida até que ficasse com espuma – emulsão de β-caroteno.

A preparação das amostras para análise em espectrofotómetro consistiu na mistura de 0,2 mL de amostra de extrato com 5,0 mL de emulsão. Esta mistura foi colocada em bloco de aquecimento a 50 °C durante 120 minutos.

Paralelamente efetuou-se um ensaio em branco pós-reação e um ensaio em branco pré-reação. No ensaio em branco pós-reação, ao invés da utilização de 0,2 mL de amostra de extrato foram utilizados 0,2 mL de metanol. Terminado o tempo de reação as amostras foram levadas ao espectrofotómetro e foi medida a absorvância a um cumprimento de onda de 470 nm. Para o ensaio em branco pré-reação foram utilizadas as mesmas condições, contudo a leitura das absorvâncias foi feita imediatamente após a mistura dos reagentes.

O resultado obtido após se efetuar o método é expresso em Coeficiente de Atividade Antioxidante (AAC), através da aplicação da fórmula seguinte:

$$AAC = \frac{AA120 - Ac120}{Ac0 - Ac120} \times 1000$$

AA120= Absorvância da amostra após 120 minutos de reação;

Ac120= Absorvância do ensaio em branco pós-reação;

Ac 0= Absorvância do ensaio em branco pré-reação.

O ensaio aqui descrito foi adaptado do método de Miller (1971).

Capítulo VI

Apresentação e Discussão dos Resultados Obtidos

Os resultados das determinações nutricionais (determinação de percentagem de proteína, determinação da humidade, percentagem de sólidos totais, teor de cinza, percentagem de matéria gorda livre, percentagem de fósforo por espetrofotometria, determinação dos cloretos solúveis e fibra), bem como das determinações do perfil antioxidante, isto é, do teor em compostos fenólicos totais, teor em flavonoides e avaliação da capacidade antioxidante, capacidade de inibição dos radicais DPPH e coeficiente de atividade antioxidante foram expressos em função da média ± desvio padrão de, pelo menos, três determinações.

Todas as análises e resultados foram testados para um nível de confiança de 95 %, usando o programa de probabilidades e dados estatísticos SPSS® (SPSS Inc. Chicago, IL, EUA).

1. Análise do perfil nutricional

A tabela III mostra os resultados obtidos nos diferentes ensaios para a determinação da composição nutricional da nova bebida formulada.

Tabela III- Composição Nutricional da bebida formulada.

Parâmetros Nutricionais	Teor (%)
Proteína	4,645±0,329
Humidade	77,721±0,279
Sólidos Totais	22,279±0,279
Cinzas	0,517±0,025
Matéria Gorda	0,166±0,007
Fósforo	0,393±0,026
Cloretos	0,449±0,111
Fibra	12,666±0,445

Para uma análise mais coerente e correta dos dados obtidos, optou-se por comparar a composição da bebida formulada (CLPS e polpa de morango) com a composição nutricional de bebidas à base de soro já presentes no mercado e que foram alvo de estudos científicos no sentido de comprovar que as bebidas à base de soro de leite de cabra podem ser um substituto nutricionalmente completo para as bebidas de leite de vaca e derivados (Shraddha *et al.*, 2015). Infelizmente, os estudos científicos, nesta área, estão maioritariamente relacionados com o soro de leite de vaca e são escassos aqueles que se debruçam sobre o soro de leite de cabra, o que dificulta a comparação dos resultados obtidos.

Ainda assim é possível fazer algumas comparações.

A concentração de proteína que a bebida provou conter é cerca de 4,55 % (4,645±0,329) ou seja, 4,645 g de proteína por cada 100 g de bebida formulada. Tal resultado está de acordo com a literatura. Segundo um estudo científico realizado em soro de leite de cabra o valor médio para o teor de proteína determinado nesse trabalho era de 5,96 g/100 g; um valor não muito distante do determinado (Araújo *et al.*, 2017). No entanto, seria de esperar uma percentagem de proteína mais elevada, pois a amostra de soro de leite de cabra inteiro foi sujeita a tratamento de ultrafiltração seguido de diafiltração a partir do qual se obteve o concentrado líquido de proteínas do soro (CLPS).

De acordo com o já descrito, o soro de leite de cabra foi sujeito a dois processos consecutivos de ultrafiltração (diafiltração) o que proporcionou uma concentração proteica de aproximadamente 18,66 vezes na UF e 12,75 na diafiltração. Em termos teóricos o fator de concentração dos componentes retidos pela membrana deveria situar-se em valores intermédios. Assumindo que o soro de cabra recebido teria uma concentração de 0,5 g/100 mL (5 g/L), tendo em conta os factores de concentração volumétrico aplicados na ultrafiltração/diafiltração, seria de esperar que o CLPS possuísse um teor de proteína superior a 5 % (50 g/L). Os valores obtidos resultarão de alguma diluição resultante de volumes mortos do equipamento de UF e da diluição com a polpa de fruta durante a preparação da bebida.

O teor de humidade determinado foi de (77,721±0,279) % o que está de acordo com a NP 1612 (2002) que indica que para produtos húmidos o teor de humidade de situar-se entre os 75 % e os 90 %.

Quanto aos sólidos totais, estes rondam aproximadamente, os 22 gramas por 100 g de bebida (22.279±0.279) %. Este valor aproxima-se do que era esperado, pois, a bebida formulada resulta da junção entre dois ingredientes (CLPS + polpa de morango) com uma constituição química e nutricional bastante complexa. É de salientar que o tratamento de desnate a que soro de leite de cabra foi sujeito no início do processo de tratamento do soro inteiro contribui para a eliminação da gordura e de outros compostos nela dissolvidos. Por

outro lado, também o processo de ultrafiltração contribui para a eliminação de água e dos compostos que nela se dissolvem, pelo que o teor de compostos sólidos diz maioritariamente respeito à proteína e lactose do CLPS e aos compostos provenientes da polpa de morango (Guerreiro *et al.*, 2015).

O teor de cinzas encontrado corresponde a uma percentagem de (0,517±0,025). Como se sabe o teor de cinzas de um produto alimentar corresponde à matéria inorgânica presente nesse mesmo produto. Neste caso, o valor determinado na bebida desenvolvida é mais baixo do que se esperava e equivale maioritariamente aos minerais que fazem parte da constituição dos morangos, pois o processo de diafiltração a que foi sujeito o soro de leite de cabra eliminou grande parte da água e sais que faziam parte da constituição inicial do soro, pelo que quando comparado com a literatura (cerca de 7 g de cinzas por 100 g de produto) este é um valor bastante mais reduzido (Shraddha *et al.,* 2015). Por outro lado, o teor de cinzas pode não corresponder totalmente ao conteúdo inorgânico presente no alimento original devido a perdas, por volatilização e interação química entre os constituintes durante o processo de inceneração da amostra o que, neste caso, pode também justificar a diferença entre o valor encontrado e o esperado (segundo a literatura).

A matéria gorda que se esperava determinar na bebida formulada seria muito diminuta o que se veio a comprovar (0,166±0,007) %. O soro de leite de cabra sofreu um processo de desnate e a polpa de morango, apesar de conter alguns ácidos gordos, pouco contribui para a matéria gorda presente na bebida final. Quando comparado com a literatura (4 g por 100 g de produto), o teor de matéria gorda da bebida formulada é bastante mais baixo (Kerasioti *et al.*, 2016a), pois estes estudos foram elaborados com soro de leite não desnatado cuja concentração de matéria gorda se encontra entre os 2 gramas e os 4 gramas por 100 gramas de amostra (Araújo *et al.*, 2017).

A percentagem dos minerais fósforo e cloreto determinados foi de (0,393±0,026) e (0,451±0,111) respetivamente. A eficácia do processo de diafiltração na eliminação da água e, por sua vez, dos sais minerais nela dissolvidos fez com que a contribuição do CLPS para o teor destes compostos fosse bastante reduzida e não se pode desprezar que o leite de cabra é um alimento cujas percentagens destes compostos são bastantes baixas de acordo com o descrito no Capítulo IV, secção IV.A.

Acrescenta-se ainda que o processo de tratamento do soro inteiro por ultrafiltração tinha que ser efetivo, pois se o teor de sal permanecesse no CLPS impediria a sua utilização para produtos para consumo humano que obedecem a estreitos limites para a presença de NaCl em alimentos, tal qual descrito em Decreto Lei n.° 75/2009 de 12 de agosto de 2009. Diário da República n.° 155/2009, Série I.

A contribuição da polpa de morango para as determinações de fósforo e cloretos não é significativa. Por um lado, o teor de cloretos nos morangos é praticamente inexistente e por outro, sua constituição em fósforo não ultrapassa as 0,013 g por 100 grama de morango fresco (Basu *et al.*, 2014).

O teor de fibra da bebida está diretamente relacionado com a fibra presente no morango, pois o tipo de fibra detetado pelo método utilizado é a fibra bruta (ou alimentar), tal qual o anteriormente descrito. Tendo em conta as características dos morangos utilizados, nomeadamente o estado de maturação avançado e o tamanho considerável das suas sementes, o teor determinado de fibra- cerca de 12 % - enquadra-se no que era esperado.

De acordo com os resultados obtidos para a caracterização nutricional da bebida desenvolvida à base de CLPS de leite de cabra e polpa de morango pode concluir-se que esta se enquadra numa dieta saudável e variada. Por outro lado o aproveitamento da fração de interesse (proteínas) do soro de leite inteiro pode ser o princípio para o desenvolvimento de outros produtos semelhantes ao desenvolvido, mas que possam ter outras aplicações, como sejam o desenvolvimento de alimentos específicos para desportistas combinando um maior enriquecimento em proteínas de soro de leite de cabra com os antioxidantes provenientes dos morangos; uma outra alternativa seria o desenvolvimento de produtos adaptados ao consumo para intolerantes à lactose, uma vez que esta é eliminada aquando do tratamento de diafiltração.

Estes são nichos de mercado que se encontram em constante desenvolvimento e expansão e que no presente são dominados por produtos cujo preço é muito elevado, estando assim ao alcance de um menor número de pessoas. Tendo em conta que estas alternativas seriam desenvolvidas a partir de produtos sobrantes das indústrias queijeira e hortofrutícola tal permitiria que os preços fossem mais competitivos levando este tipo de alimentos a um maior número de consumidores.

2. Análise do perfil antioxidante

A composição em antioxidantes foi elaborada recorrendo à determinação do teor em compostos fenólicos totais e teor em flavonoides. Por seu turno a capacidade antioxidante da bebida foi avaliada segundo o teste de inibição dos radicais DPPH e coeficiente de atividade antioxidante.

Seria de esperar que o conteúdo antioxidante da bebida equivalesse ao conteúdo antioxidante dos morangos, pois na literatura são poucos os estudos científicos que associam ao soro de leite de cabra qualquer conteúdo nestes compostos. Assim, a comparação entre os valores encontrados e os esperados estaria facilitada, uma vez que, a caracterização dos compostos antioxidantes dos morangos é uma temática já bastante desenvolvida na literatura e sobre a qual existem bastantes resultados.

A determinação do teor em compostos fenólicos totais através do método de Folin-Ciocalteau permite apresentar os resultados sob a forma de miligrama de equivalentes de ácido gálico (GAE) por grama de amostra. Para tal construiu-se uma curva de calibração que permitiu correlacionar através da equação a relação entre a absorvância e a concentração de ácido gálico. A equação da curva de calibração foi y= 7,0205x-0,0057 e o coeficiente de correlação (r^2) de 0,989 (Anexo I). O teor de compostos fenólicos totais foi de (3,473±0,15) mg de Equivalentes de Ácido Gálico por grama de amostra. Segundo a literatura, o conteúdo em compostos fenólicos totais dos morangos encontra-se entre 0,015 mg e 0,067 mg por grama de morangos frescos (Afrin *et al.*, 2016).

O conteúdo em flavonoides totais foi determinado através de um ensaio espectrofotométrico que permitiu a construção da curva de calibração que exprime a relação entre a concentração de (-)-epicatequina (ECE) e a absorvância. Desta forma, os resultados foram expressos miligrama de ECE por g de amostra. A equação da reta de calibração foi y=1,3243x + 0,0293 e o coeficiente de correlação (r^2) foi de 0,9795 (Anexo II).

O teor de flavonoides foi de (5,066±0.050) mg ECE por g de amostra. A literatura indica que conteúdo em flavonoides, neste caso, expresso em miligramas de epicatequina (uma vez que este é o composto maioritário desta classe moléculas presentes no morango) se encontra entre os 0,617mg e os 0,741mg de epicatequina por grama de morangos frescos (Afrin *et al.*, 2016).

Como se sabe o conteúdo em compostos antioxidantes é dependente da época de cultivo e de apanha do morango, bem como das características intrínsecas à variedade do fruto em questão e do método de processamento pós-colheita; todas estas variantes podem ser uma explicação para o conteúdo mais elevado destes compostos nas amostras estudadas; pois tal

qual o já descrito os morangos utilizados encontravam-se em avançado estado de maturação. Quanto mais maduro o fruto se encontrar, maior será a percentagem de compostos antioxidantes nele presentes.

Por outo lado, existem já estudos que relatam o efeito de extratos de proteínas de soro de leite de cabra no combate ao stress oxidativo e que evidenciam capacidade antioxidante (Kerasioti *et al.*, 2016b). Tal evidência pode sugerir a presença de moléculas com atividade antioxidante na constituição do soro o que pode (a par do já descrito) explicar os valores determinados.

Este é um tema recente, mas que desperta a curiosidade da comunidade científica das áreas da bromatologia e nutrição que começam agora a investigar como e quais os tipos de moléculas por detrás da capacidade antioxidante das proteínas do soro de leite de cabra (Araújo *et al.*, 2017).

Quanto à capacidade antioxidante esta foi traduzida em função da capacidade de inibição dos radicais DPPH, bem como da determinação do coeficiente de atividade do β- Caroteno. Os resultados do ensaio que permite avaliar a capacidade de inibição dos radicais DPPH, são expressos em função da curva de calibração que mostra a relação que existe entre a concentração do reagente de Trolox e a absorvância. Esta é uma relação de proporcionalidade inversa, isto é, à medida que aumenta a concentração de reagente de Trolox a absorvância diminui, porque é maior a capacidade de inibição do radical DPPH (Martins, 2018).

A curva de calibração foi descrita pela equação y= -1,289x + 0,4128 e o coefiente de correlação (r^2) foi de 0,9908 (Anexo III).

A capacidade de inibição do radical DPPH é expressa em mg de Equivalentes de Trolox (ET) por grama de amostra e o seu valor foi (0,106± 0,075) mg ET por grama de bebida formulada.

O outro ensaio escolhido para determinar a capacidade antioxidante, foi o da determinação do coeficiente de atividade antioxidante (AAC). Este revelou um valor de (282,407± 0.005) o que se encontra dentro dos valores esperados quando comparado com a literatura (Moure *et al.*, 2001).

Em suma, considerando os resultados obtidos, surge aqui a oportunidade para referir que o aproveitamento de morangos não comercializáveis devido as suas características de calibre e/ou estética em nada afeta o teor e a capacidade antioxidante. Mais se acrescenta que poderá existir um efeito aditivo entre as características antioxidantes dos morangos e essas mesmas possíveis características do CLPS de leite de cabra.

Capítulo VII

Conclusão

O principal objetivo deste projeto de dissertação foi apresentar uma solução para dois grandes problemas da indústria alimentar, mais concretamente da indústria queijeira e hortofrutícola.

Em concreto, o problema associado ao fabrico de queijo que resulta, em grande parte, do excesso de produção de soro de leite, nomeadamente, de cabra e, por outro lado, pretendeu-se solucionar as questões associadas à produção de morangos, sobretudo no que diz respeito ao desperdício que existe devido à seleção deste fruto quanto às características estéticas e/ou de calibre e que impedem a comercialização de uma boa parte dos morangos frescos produzidos no nosso país. Em alguns casos, os agricultores descartam entre 20 % a 40 % dos seus produtos frescos porque não apresentam as características estéticas que as empresas de retalho exigem (Pereira, 2014).

A solução apresentada para estas duas problemáticas passou pela formulação de um novo produto alimentar que tivesse, na sua génese, o aproveitamento destes subprodutos, combatendo-se desta forma, o desperdício alimentar e melhorando a sustentabilidade da cadeia de abastecimento de alimentos no nosso país.

Desta forma, transformaram- se dois "resíduos" numa bebida de concentrado líquido de proteínas de soro de leite de cabra e morangos que em tudo se assemelha a um *smoothie*.

Por outro lado, pretendeu-se com este trabalho não só criar a bebida, como fazer dela uma mais-valia a nível nutricional e que se enquadre numa dieta saudável.

Tanto os morangos como o concentrado líquido de proteínas do soro de leite são produtos que se enquadram num regime alimentar adequado e que se pretende cada vez mais sustentável.

Importa referir ainda que estão estudados e comprovados cientificamente os benefícios associados ao consumo de morangos e de proteínas de soro de leite de cabra *per se,* pelo que a sua junção neste novo alimento faz todo o sentido e os resultados deste trabalho vieram comprová-lo, nomeadamente no que diz respeito ao conteúdo em compostos antioxidantes.

Esta bebida apresenta características que permitem classificá-la como um alimento saudável e seguro e que pode ser consumido por um espetro largo de população, além de que, num futuro (que se espera próximo), este trabalho pode ser um ponto de partida para a introdução deste tipo de bebidas no mercado, abrindo portas para o empreendedorismo. Neste ponto é relevante referir que para além do soro de leite de cabra, também o de vaca e de ovelha podem ter um especial interesse. A partir destes subprodutos, a par de mais investigação, pode ser possível criar novos alimentos de sabor e características nutricionais diversas e que vão ao encontro de nichos de mercado, como a alimentação para desportistas, vegetarianos, intolerantes à lactose entre outros. Acresce por isso dizer, que a metodologia

de desenvolvimento da bebida à base de CLPS de leite de cabra e morangos é um processo de fabrico facilmente industrializável. Sabe-se que o mercado onde estas bebidas se podem posicionar caracteriza-se por consumidores mais atentos e que direcionam a sua atenção não só para as características nutricionais, como também para a rotulagem e segurança dos produtos, bem como para a sua origem e método de produção. Trata-se de um mercado onde se procura o mais saudável e o mais sustentável, pois estes consumidores além de estarem preocupados com a sua saúde, estão também bastante atentos à preservação do nosso planeta e respetivos recursos naturais.

No entanto, este projeto é só o começo e muito há ainda a fazer para que esta bebida possa ser comercializada. Entre outros aspetos serão necessários estudos de prazo de validade e de análise sensorial, bem como de otimização das características organoléticas.

Como objetivo secundário e por uma questão de responsabilidade social (e também científica) com este trabalho pretende-se despertar para uma reflexão sobre a sustentabilidade do sistema de produção, consumo e desperdício que continua a reger a sociedade atual.

O Homem, na verdadeira aceção da palavra, tem que se salvaguardar com conhecimento, tem que preocupar-se, de forma sistemática e contínua, não só com o seu presente, mas também com a qualidade de vida das gerações vindouras, para isso deve ser e estar sensibilizado para a problemática do desperdício alimentar e da sustentabilidade ambiental, os quais devem estar aliados a uma alimentação que se pretende cada vez mais saudável, pois não se pode esquecer que em simultâneo, e neste presente, existem 800 milhões de pessoas famintas que vivem num mundo de 800 milhões de obesos ou com excesso de peso (FAO, 2017).

Bibliografia

AFRIN, S. [et al.]- Promising Health Benefits of the Strawberry: A Focus on Clinical Studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [Em linha]. Vol. 64, nº 22 (2016), p. 4435-4449. [Consult. 19 mai. 2018]. Disponível na internet: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.6b00857

AGÊNCIA EUROPEIA AMBIENTE- **Desperdício dos Alimentos**. [Em linha]. [Consult. 3 mar. 2018]. Disponível em: https://www.eea.europa.eu/pt/sinais-da-aea/sinais-2012/em-analise/desperdicio-de-alimentos

ARAÙJO, D. [et al.]- Intestinal anti-inflammatory effects of goat whey on DNBS-induced colitis in mice. **PLoS ONE** [Em linha]. Vol. 12, nº 9 (2017), p. 1-19. [Consult. 15 fev. 2018]. Disponível na internet: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0185382

BRIMELOW, R. [et al.]- A role for whey-derived lactoferrin and immunoglobulins in the attenuation of obesity-related inflammation and disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. [Em linha]. Vol. 57, nº 8 (2017), p. 1593-1602. [Consult. 15 fev. 2018]. Disponível na internet: http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2014.995264

BAPTISTA, P. [et al.] (2012)- **Do Campo ao Garfo, Desperdício Alimentar em Portugal**. 1ª ed. Lisboa. CESTRAS, 2012. ISBN 9789004310087.

BASU, A. [et al.]- Strawberries, blueberries, and cranberries in the metabolic syndrome: Clinical perspectives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [Em linha]. Vol. 60, nº 23 (2012), p. 5687-5692. [Consult. 20 mai. 2018]. Disponível na internet: https://www.researchgate.net/publication/51797278_Strawberries_Blueberries_and_Cranberries_in_the_Metabolic_Syndrome_Clinical_Perspectives

Decreto Lei nº 75/2009 de 12 de agosto de 2009. Diário da República n.º 155/2009, Série I.

DGAV- O Rendimento do leite na produção de queijos**.** [Em linha]. [Consult. 8 fev. 2018]. Disponível em: http://www.proder.pt/ResourcesUser/Documentos_Diversos/221/Rendi

mento_leite_na_producao_queijos.pdf

DGS- **Dieta Mediterrânica**. [Em linha]. [Consult. 13 jul. 2018]. Disponível em: http://www.alimentacaosaudavel.dgs.pt/biblioteca/dm-o-que-e/

EFSA, NDA Panel- Guidance on the scientific requirements for health claims related to antioxidants, oxidative damage and cardiovascular health. **EFSA JOURNAL**. [Em linha]. Vol. 9, n°12 (2011), p. 24-74 [Consult. 2 mai. 2018]. Disponível na internet: https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2011.2474

EFSA, NDA Panel- Scientific Opinion on Dietary Reference Values for protein. **EFSA JOURNAL**. [Em linha]. Vol. 10, n° 2 (2012), p. 25-57. [Consult. 12 jun. 2018].Disponível na internet: http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2012.2557

EFSA, NDA Panel-Scientific Opinion on Dietary Reference Values for folate. **EFSA JOURNAL**. [Em linha]. Vol. 12, n° 11 (2014), p. 22-26. [Consult. 2 mai. 2018]. Disponível na internet: http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2014.3893

EFSA- Dietary Reference Values for nutrients Summary report**. EFSA JOURNAL**.[Em linha]. Vol. 14, n° 12 (2017), p. 18-22. [Consult. 13 jun. 2018]. Disponível na internet: http://doi.wiley.com/10.2903/sp.efsa.2017.e15121

ERKAN, N. [et al.]- Antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus Officinalis L.) extract, blackseed (Nigella sativa L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol.**Food Chemistry**.[Em linha]. Vol. 110, n° 1 (2008), p. 76-82. [Consult. 1 mar. 2018].Disponível na internet: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608001520?via%3Dihub

FAO- **Global food losses and food waste - Extent, causes and prevention**. 1ª ed. Roma. Roma, 2011. ISBN 978-92-5-107205-9.

FAO- **How to Feed the World in 2050**. 1ª ed. Roma. Roma, 2009. ISBN 3465034295.

FAO- **Statistical Pocketbook-World food and agriculture**. 1ª ed. Roma. Roma, 2015. ISBN 978-92-5-108802-9.

FERNANDES, D. (2013)- Composição química e propriedades organoléticas do leite de cabra de raça Charnequeira**.** Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar e Processamento de Alimentos. Instituto Superior de Agronomia- Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 43 pp.

FERNANDES, M. [et al.]- Determinação do teor de humidade em salsichas tipo Frankfurt utilizando micro-ondas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. [Em linha]. Vol. 102, n° 1 (2007), p. 327-330. [Consult. 20 fev. 2018]. Disponível na internet: www.fmv.ulisboa.pt/spcv/PDF/pdf12_2007/327-330.pdf

FERREIRA, M. [et al.]- **Dimenções da Dieta Mediterrânica: Património Cultural Imaterial da Humanidade.** 1ª ed. Algarve. Universidade do Algarve, 2015. ISBN 978-989-8472-73-1.

FORBES-HERNANDEZ, T. [et al.]- The Healthy Effects of Strawberry Polyphenols: Which Strategy behind Antioxidant Capacity?. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.** [Em linha]. Vol.56, nº 1 (2016), p. 46-59. [Consult. 21 abr. 2018]. Disponível na internet: https://www.researchgate.net/publication/281710747_The_Healthy_Effects_of_Strawberry_Polyphenols_Which_Strategy_behind_Antioxidant_Capacity

GIAMPIERI, F. [et al.]-Strawberry and human health: Effects beyond antioxidant activity. **Strawberry and human health: Effects beyond antioxidant activity**. [Em linha]. Vol. 62, nº 18 (2014), p. 3867-3876. [Consult. 20 mai. 2018]. Disponível na internet: https://www.researchgate.net/publication/259875831_Strawberry_and_Human_Health_Effects_Beyond_Antioxidant_Activity

GIAMPIERI, F. [et al.]- The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition.** [Em linha]. Vol. 28, nº 1 (2012), p. 9-19. [Consult. 9 mai. 2018]. Disponível na internet:: https://www.nutritionjrnl.com/article/S0899-9007(11)00306-6/abstract

GIAMPIERI, F [et al.]- The health effects of strawberry bioactive compounds on molecular pathways related to chronic diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**. [Em linha]. Vol. 1398, nº 1 (2017), p. 62-71. [Consult. 201 abr. 2018]. Disponível na internet: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28618011

GROZIAK, S. [et al.]-Natural bioactive substances in milk and colostrum: effects on the arterial blood pressure system. **The British journal of nutrition**. [Em linha]. Vol. 84, nº 1 (2000), p. 1-15. [Consult. 30 Mar. 2018]. Disponível na internet: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11242456

GUERREIRO, D. (2015) - Contribuição para desenvolvimento de suplemento alimentar proteico e antioxidante produzido a partir de subprodutos da indústria alimentar. Tese de Mestrado em Segurança Alimentar. Faculdade de Farmácia-Universidade de Coimbra, Coimbra. 60 pp.

HARAGUCHI, F. [et al.] - Proteínas do soro do leite: Composição, propriedades nutricionais e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**. [Em linha]. Vol. 19, nº 4 (2006), p. 479-488. [Consult. 30 Mar. 2018]. Disponível na internet: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732006000400007

HINRICHS, J. [et al.]- Mediterranean milk and milk products. **European Journal of Nutrition**. [Em linha]. Vol. 43, n° 1 (2004), p. 12-17. [Consult. 15 jun. 2018]. Disponível na internet: http://link.springer.com/10.1007/s00394-004-1104-8

HOFFMANN, C. (2003)- Estudo da utilização de concentrado proteico de soro de queijo ultrafiltrado (cpsu), em requeijão cremoso. Tese de Mestrado em Ciência dos Alimentos. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias- Universidade Federal de Santa Catarina, Frianópolis. 101pp.

INE (2016)- **Estatísticas Agrícolas 2016.** 1ª ed. Lisboa. Instituto Nacional de Estatística, I.P., 2016. ISBN 978-989-25-0395-0

JENSEN, W-The Origin of the Soxhlet Extractor**. Journal of Chemical Education**. [Em linha]. Vol. 84, n°12 (2007), p. 1913. [Consult. 21 fev. 2018]. Disponível na internet: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed084p1913?journalCode=jceda8

KERASIOTI, E.[et al.]- Increase in antioxidant activity by sheep/goat whey protein through nuclear factor-like 2 (Nrf2) is cell type dependent. **Food and Chemical Toxicology**. [Em linha]. Vol. 97, n° 10 (2016a), p. 47-56. [Consult. 2 mar. 2018]. Disponível na internet: http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.022

KERASIOTI, E. [et al.]- Antioxidant Effects of Sheep Whey Protein on Endothelial Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. [Em linha]. Vol. 2016, n° 1 (2016b), p. 1-10. [Consult. 2 mar. 2018]. Disponível na internet: https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/6585737/abs/

LI, Y. [et al.]- Effects of fat content, pasteurization method, homogenization pressure, and storage time on the mechanical and sensory properties of bovine milk. **Journal of Dairy Science** .[Em linha]. Vol.101, n° 4 (2018), p. 2941-2955. [Consult. 21 abr. 2018]. Disponível na internet: https://doi.org/10.3168/jds.2017-13568

LOPES, C. [et al.] (2017) -**Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física.** 1ª ed. Porto. Universidade do **Porto,** 2017. ISBN 9789897461811.

MÆHRE, H. [et al.]- Protein Determination-Method Matters.**Critical Foods**. [Em linha]. Vol.7, n° 1 (2018), p. 1-5. [Consult. 21 abr. 2018]. Disponível na internet: http://www.mdpi.com/2304-8158/7/1/5

MAEQUÉZ, F. [et al.]- A pattern of healthy feeding: the traditional Mediterranean diet. **Antropo.** [Em linha]. Vol. 1, p. 11-22. [Consult. 10 jun.2018]. Disponível na internet: http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3107905&info=resumen&idioma=ENG

MANDAVE, P. [et al.]- Antidiabetic, lipid normalizing, and nephroprotective actions of the strawberry: A potent supplementary fruit. **International Journal of Molecular Sciences**.[Em linha]. Vol. 18, n° 1 (2017), p. 1099-1103. [Consult. 20 abr. 2018]. Disponível na internet: http://www.mdpi.com/1422-0067/18/1/124/htm

MANGANARIS, G. [et al.]- Berry antioxidants: Small fruits providing large benefits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. [Em linha]. Vol. 94, n° 5 (2014), p. 825-833. [Consult. 2 mai. 2018]. Disponível na internet: https://doi.org/10.1002/jsfa.6426

MARTINEZ, R. [et al.]- Mediterranean diet and health outcomes: a systematic meta-review. **European Journal of Public Health** [Em linha]. Vol. 22, n° 6 (2018), p.113. [Consul. 9 jun. 2018]. Disponível na internet: https://academic.oup.com/eurpub/advance-article-abstract/doi/10.1093/eurpub/cky113/5050889?redirectedFrom=fulltext

MOURE, A. [et al.] - Antioxidant activity of extracts from Gevuina avellana and Rosa rubiginosa defatted seeds. **Food Research Internacional.** [Em linha]. Vol. 34, n° 2 (2001), p. 103-109.[Consult. 2 mar. 2018]. Disponível na internet: https://www.researchgate.net/journal/0963-9969_Food_Research_International

Norma Portuguesa NP 590 (2009) Determinação da Proteína Bruta. 2ªEdição. Portugal: Instituto Português da Qualidade, 2009.

Norma Portuguesa NP 1224 (2002) Determinação da Matéria Gorda Livre em Carnes, Derivados e Produtos Cárneos. 1ªEdição. Portugal: Instituto Português da Qualidade, 2002

Norma Portuguesa NP 1612 (2002) Determinação da Humidade para Produtos Húmidos. 1ªEdição. Portugal: Instituto Português da Qualidade, 2002

Norma Portuguesa NP 1615 (2002) Determinação da de Cinza Total- Método de Referência. 1ªEdição. Portugal: Instituto Português da Qualidade, 2002

Norma Portuguesa NP 1842-1 (2008) Determinação do teor total de fósforo-Método de Referência. 2ªEdição. Portugal: Instituto Português da Qualidade, 2008

Norma Portuguesa NP 1845-1 (1982) Determinação do teor de cloretos-Método Corrente. 1ªEdição. Portugal: Instituto Português da Qualidade, 1982

OMS- **Health topics. Obesidade.** [Em linha]. [Consult. 19 jul. 2018]. Disponível em: http://www.who.int/topics/obesity/en

PALHA, M. G (2005).- **Manual do Morangueiro**. 193ª ed. Lisboa, Estação Agronómica Nacional, 2005. ISBN 972-579-030-8.

PARLAMENTO EUROPEU- **Proposta de resolução do Parlamento Europeu sobre o desperdício alimentar.** [Em linha]. [Consult. 3 mar. 2018]. Disponível em: http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?pubRef=-//EP//TEXT+MOTION+B8-2017-0118+0+DOC+XML+V0//PT

PEREIRA M. (2014) - O desperdício alimentar de produtos hortofrutícolas. Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologias- Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 97pp REGULAMENTO DE EXECUÇÃO (UE) N° 543/2011 DA COMISSÃO de 7 de junho de 2011. Jornal Oficial da União Europeia n° 157/1, Bruxelas, Bélgica.

REGULAMENTO (CE) N° 1234/2007 DO CONSELHO de 22 de outubro de 2007.Jornal Oficial da União Europeia n° 299/1, Bruxelas, Bélgica.

SÁEZ-PLAZA [et al.]- An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination. Part I. Early History, Chemistry of the Procedure, and Titrimetric Finish. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**. [Em linha]. Vol.43, n° 4 (2013), p. 178-223. [Consult. 20 fev. 2018]. Disponível na internet: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408347.2012.751786

SERRA-MAJEM, L. [et al.]- Food, youth and the Mediterranean diet in Spain. **Public Health Nutrition.** [Em linha]. Vol. 7, n° 7 (2004), p. 931-935. [Consult. 12 jun. 2018]. Disponível na internet: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S136898000400117X

SHRADDHA, R. [et a.l]- Whey Based Beverage: Its Functionality, Formulations, Health Benefits and Applications. **Journal of Food Processing & Technology.** [Em linha]. Vol. 6, n° 10 (2015), p. 100-109. [Consult. 2 mar. 2018]. Disponível na internet: https://www.omicsonline.org/open-access/whey-based-beverage-its-functi

SKROVANKOVA, S. [et al.] -Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. **International Journal of Molecular Sciences**.[Em linha]. Vol. 16, n° 10 (2015), p. 24673-24706. [Consult. 19 mai. 2018]. Disponível na internet: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4632771/

UNESCO- **Mediterranean Diet**. [Em linha]. [Consult. 13 jul. 2018]. Disponível em: https://ich.unesco.org/en/RL/mediterranean-diet-00884

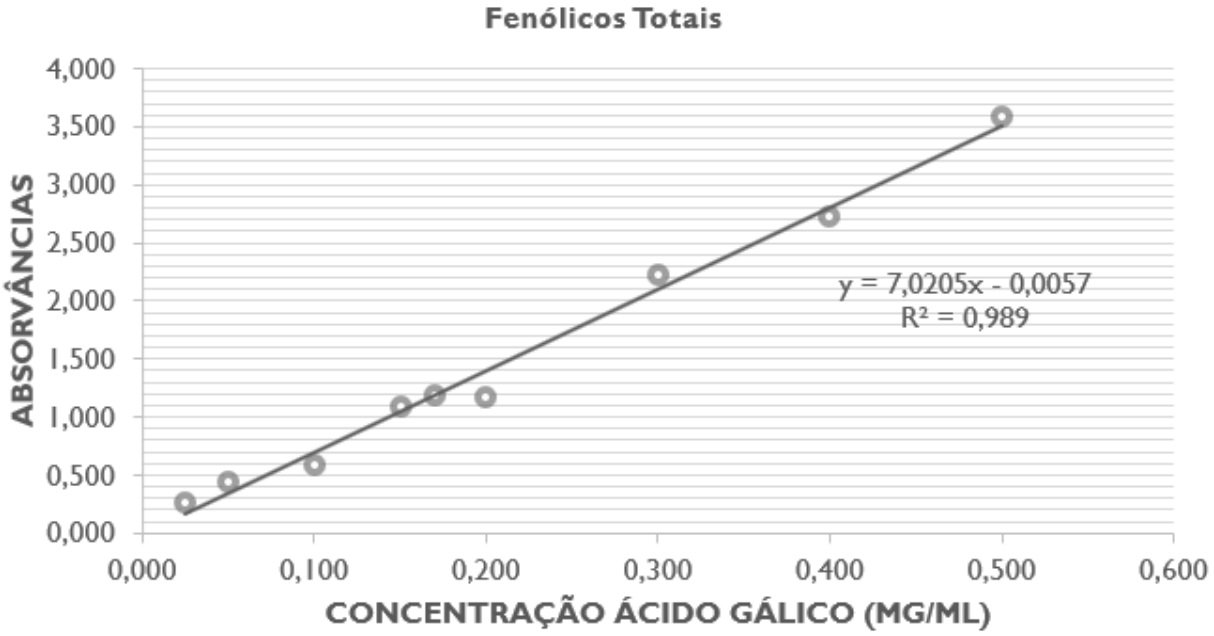
V. GANTNER [et al.]- The overall and fat composition of milk of various species. **Mljekarstvo**. [Em linha]. Vol. 65, n° 4 (2015), p. 223-231 [Consult. 8 set. 2018]. Disponível na internet: https://scholar.google.pt/scholar?q=The+overall+and+fat+composition+of+milk+of+various+species&hl=pt-PT&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholart

WILLIS, L. [et al.]- Recent advances in berry supplementation and age-related cognitive decline. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**. [Em linha]. Vol. 1, n° 1 (2009), p. 91-94. [Consult. 20 abr. 2018]. Disponível na internet: https://www.researchgate.net/publication/23572138_Recent_advances_in_berry_supplementation_and_age-related_cognitive_decline

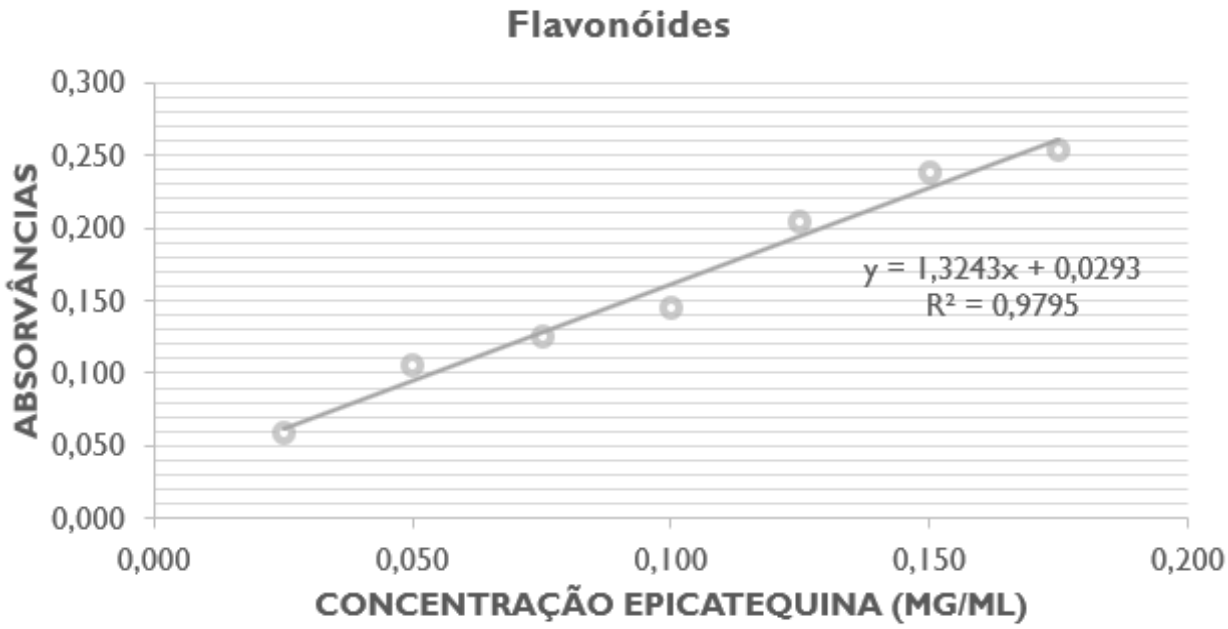
YOO, K. M. [et al.]- Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. **Food Chemistry.** [Em linha]. Vol. 106, n° 3 (2008), p. 929–936. [Consult. 2 mar. 2018]. Disponível na internet: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814607006814

Anexos

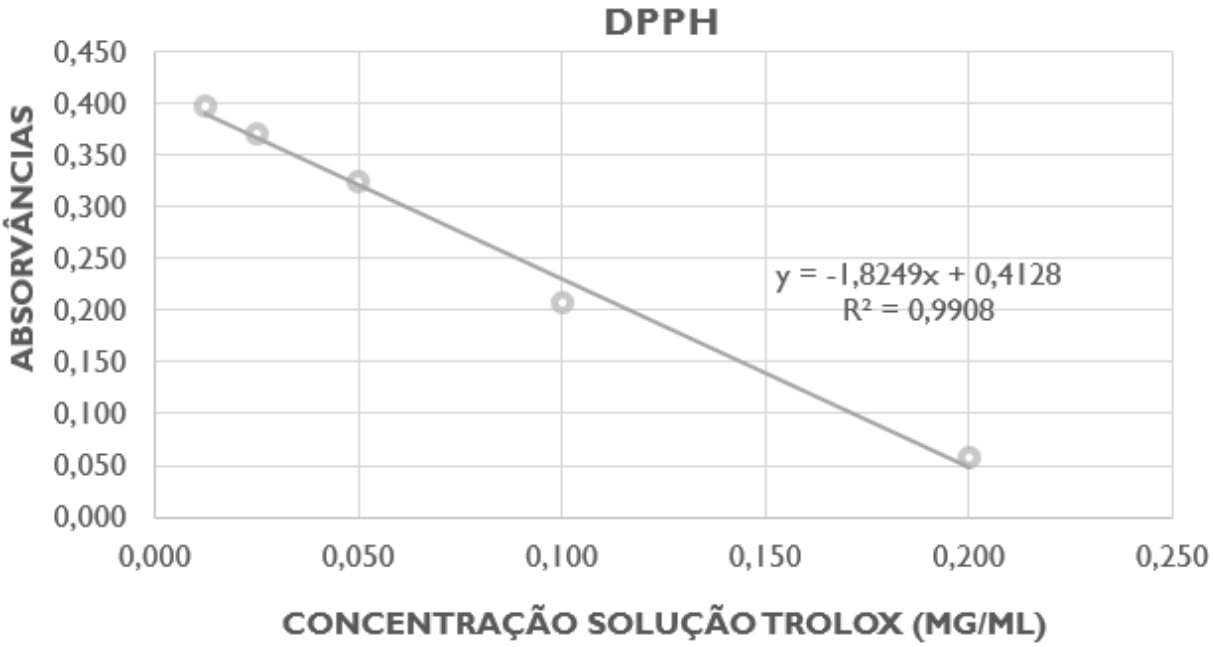
I- Curva de calibração absorvância vs. Concentração de Ácido gálico



II- Curva de calibração absorvância vs. Concentração de (-)-epicatequina



III- Curva de calibração absorvância vs. concentração de Solução Trolox



i

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