

**COMPOSTOS BIOATIVOS
PROVENIENTES DE FONTES NATURAIS
COMO ALTERNATIVA A CONSERVANTES
SINTÉTICOS**

-

INCORPORAÇÃO EM IOGURTES

SARA RIBEIRO SILVA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
À FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM
ENGENHARIA QUÍMICA

Mestrado em Engenharia Química

Compostos bioativos provenientes de fontes naturais como alternativa a conservantes sintéticos – Incorporação em iogurtes

Dissertação de Mestrado

de

Sara Ribeiro Silva

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

Laboratory for Process Engineering, Environment, Biotechnology and Energy (LEPABE)

Orientador na FEUP: **Professora Doutora Lúcia Santos**



julho de 2022

Agradecimentos

Antes de mais, gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Lúcia Santos, pela confiança depositada em mim para desenvolver este projeto, assim como pela atenção e dedicação demonstradas nestes últimos meses.

Gostaria de agradecer à Sara Ferreira, pela constante motivação, colaboração e disponibilidade durante o desenvolvimento deste projeto, à Sandra Gomes por toda a ajuda prestada, e à Zizina Falé, pelo incentivo. Às três, obrigada pelo apoio e amizade.

A todos os membros pertencentes ao laboratório E201 do Departamento de Engenharia Química, agradeço a colaboração, apoio e abertura para experimentarem os meus iogurtes. Agradeço ainda terem-me permitido e facilitado o acesso ao material e equipamento.

Gostaria também de agradecer ao Dr. Luís Carlos, do laboratório E043 do Departamento de Engenharia Química, pela sua ajuda nos testes de viscosidade. E agradeço também aos técnicos de laboratório – Fátima, Joana, Sílvia, Carla e Zé Luís – pela constante disponibilidade e apoio.

Aos meus pais, que palavras não chegam para agradecer toda a motivação, carinho e atenção durante todo este percurso. A eles agradeço o apoio incondicional, incentivo, amizade e todas as oportunidades que me proporcionaram.

Aos meus avós agradeço todo apoio e o carinho, e a quem também me viu crescer, agradeço toda a dedicação. E a todos os meus amigos, do início, meio ou fim do meu percurso, obrigada pelo companheirismo e amizade.

Por fim, agradeço a todos os que direta ou indiretamente contribuíram para este projeto, que me proporcionou momentos importantes de crescimento pessoal e profissional.

Este trabalho foi financiado por LA/P/0045/2020 (ALiCE), UIDB/00511/2020 e UIDP/00511/2020 (LEPABE), financiado por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC). Projeto HealthyWaters (NORTE-01-0145-FEDER-000069), cofinanciado pelo Programa Operacional Regional do Norte (NORTE 2020), através do Portugal 2020 e do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER). MORfood (Ref.^a. 541163254/2019) - Microencapsulation of *Moringa Oleifera* extracts and its application in functional foods to mitigate children malnutrition in developing countries, founded by Foundation for Science and Technology (FCT) and Aga Khan Development Network (AKDN).

Resumo

Nos últimos anos, verificou-se um aumento da procura de alimentos com conservantes de origem natural. Paralelamente, são crescentemente reconhecidos os efeitos nocivos da acumulação de subprodutos agrícolas. Este trabalho visa desenvolver um produto de valor acrescentado, um iogurte fortificado com extratos obtidos a partir de subprodutos agrícolas, ricos em compostos bioativos que possam ser uma alternativa aos conservantes de origem sintética.

Os subprodutos utilizados foram cascas de melão e abóbora, aos quais foram extraídos os compostos bioativos. Para as cascas de melão, o processo foi conseguido através de duas extrações sólido-líquido, com recurso a ultrassons e Soxhlet, obtendo-se um rendimento de 23,84 %. Para as cascas de abóbora, recorreu-se ao Soxhlet, e foi obtido um rendimento de extração de 39,78 %.

Posteriormente realizou-se a avaliação dos extratos obtidos, determinando o conteúdo fenólico total, através do ensaio do Reagente Folin-Ciocalteu, tendo-se obtido uma concentração de 53,41 mg_{GAE}g⁻¹_{extrato} para o extrato de casca de melão e 18,21 mg_{GAE}g⁻¹_{extrato} para o extrato de casca de abóbora. Seguidamente, foi determinada a capacidade antioxidante, através do ensaio com 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), no qual se obteve uma percentagem de inibição do DPPH de 62,85 % e 7,398 %, um TEAC de 153,9 μmol_{Trolox}g⁻¹_{extrato} e 41,91 μmol_{Trolox}g⁻¹_{extrato}, e um IC₅₀ de 192,4 mg_{extrato}L⁻¹ e 698,0 mg_{extrato}L⁻¹ para o extrato de casca de melão e abóbora, respetivamente. Por fim, foi avaliada a capacidade antimicrobiana, tendo sido verificado efeito inibitório do extrato de casca de abóbora para a *Staphylococcus aureus*. Não se verificou efeito inibitório de nenhum dos extratos para a *Escherichia coli*.

Finalmente produziram-se os iogurtes, tendo sido desenvolvidas oito formulações, com diferenças na concentração de ácido sórbico, o conservante sintético escolhido, e nos extratos. Os iogurtes foram sujeitos a testes de estabilidade, durante 14 dias.

Os iogurtes incorporados com extratos apresentaram características similares ao iogurte com ácido sórbico. Foram assim produzidos iogurtes cujas capacidades antioxidante e antimicrobiana resultam da presença de conservantes de origem natural, constituindo uma alternativa interessante aos conservantes de origem sintética. Apesar do iogurte com extrato de casca de melão ser o que apresentou maior capacidade antioxidante, o iogurte com extrato de casca de abóbora apresentou melhor capacidade antimicrobiana e foi alvo da preferência de um painel constituído por 10 voluntários.

Palavras-chave: Cascas de melão, Cascas de abóbora, Antioxidantes, Capacidade Antimicrobiana, Iogurtes.

Abstract

In the recent years, there has been an increase in demand for foods with preservatives of natural origin. There has also been a growing recognition of the harmful effects of the accumulation of agricultural by-products. This work aimed at developing a value-added product, namely a yoghurt fortified with extracts obtained from agricultural by-products, rich in bioactive compounds, that could be an alternative to preservatives of synthetic origin.

The by-products used were melon and pumpkin peels, from which the bioactive compounds were extracted. For the melon peels, the process was achieved through two solid-liquid extractions, using ultrasounds and Soxhlet, obtaining a yield of 23.84 %. For the pumpkin peels, Soxhlet was used, and an extraction yield of 39.78 % was obtained.

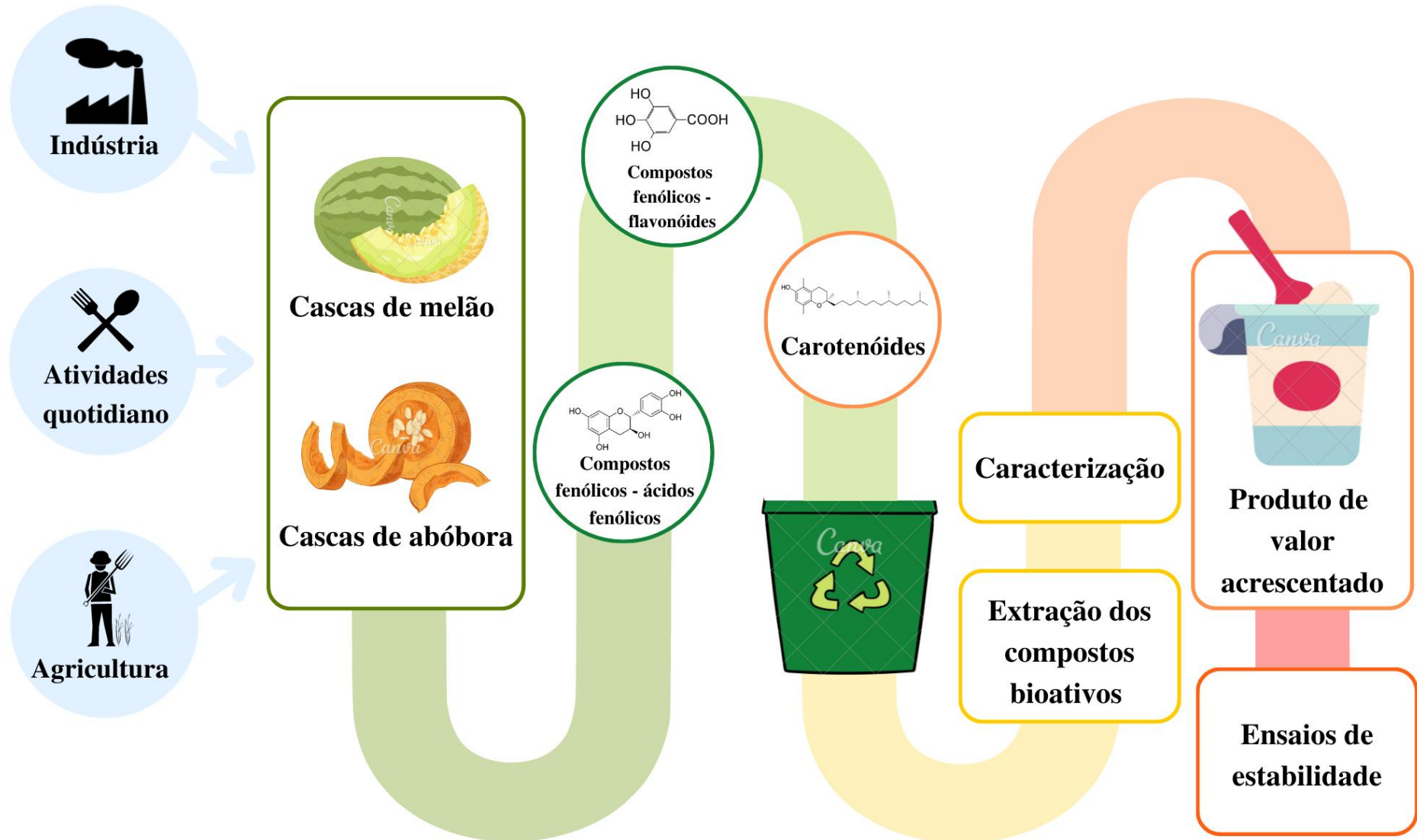
Afterwards the extracts were evaluated by defining the total phenolic content, through the Folin-Ciocalteu Reagent assay, from which a concentration of 53.41 mg_{GAE}g⁻¹_{extract} for the melon peel extract and 18.21 mg_{GAE}g⁻¹_{extract} for pumpkin peel extract were found. Then, the antioxidant capacity was determined, through the test with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), in which a percentage of DPPH inhibition of 62.85 % and 7.398 %, a TEAC of 153.9 μmol_{Trolox}g⁻¹_{extract} and 41.91 μmol_{Trolox}g⁻¹_{extract} and a IC₅₀ of 192.4 mg_{extract}L⁻¹ and 698.0 mg_{extract}L⁻¹ was determined for the melon and pumpkin peel extract, respectively. Finally, the antimicrobial properties were evaluated, and an inhibitory effect of pumpkin peel extract against *Staphylococcus aureus* was verified. There was no inhibitory effect of any of the extracts for *Escherichia coli*.

Finally, the yoghurts were produced with eight formulations, with differences in the concentration of sorbic acid, the chosen synthetic preservative, and in the extracts. Yoghurts were then subjected to stability assays for 14 days.

Yoghurts incorporated with extracts showed similar characteristics to the yoghurt with sorbic acid. As such, yoghurts were produced with antioxidant and antimicrobial properties that resulted from preservatives of natural origin, being an interesting substitute for preservatives of synthetic origin. Despite the yoghurt with melon peel extract being the one that revealed highest antioxidant capacity, the yoghurt with pumpkin peel extract showed the best antimicrobial capacity and was preferred by a panel of 10 people.

Keywords: Melon peels, Pumpkin peels, Antioxidants, Antimicrobial capacity, Yoghurts

Resumo gráfico



Declaração

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Porto, 4 de julho de 2022

Sara Ribeiro Silva

(Sara Ribeiro Silva)

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Resumo gráfico	vii
1 Introdução	1
1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto	1
1.2 Organização da Dissertação	2
2 Contexto e Estado da Arte	4
2.1 Indústria alimentar	4
2.1.1 Aditivos alimentares	4
2.2 Subprodutos agrícolas	5
2.2.1 Compostos de interesse nos subprodutos	8
2.2.2 Exemplos de subprodutos de origem nacional	8
2.2.3 Iogurte	10
2.2.4 Estabilidade do produto	11
3 Materiais e Métodos	12
3.1 Reagentes	12
3.2 Materiais e equipamento	12
3.3 Obtenção e pré-tratamento das cascas	13
3.4 Obtenção dos extratos	13
3.5 Avaliação das propriedades dos extratos	14
3.5.1 Conteúdo fenólico total	14
3.5.2 Capacidade antioxidante	14
3.5.3 Atividade antimicrobiana	14
3.6 Produção do iogurte e incorporação dos extratos	15
3.7 Testes de estabilidade	16

3.7.1	Teste de pH	16
3.7.2	Sinérese	16
3.7.3	Capacidade antimicrobiana	16
3.7.4	Conteúdo fenólico total	17
3.7.5	Capacidade antioxidante	17
3.7.6	Viscosidade aparente.....	17
3.8	Acondicionamento, tratamento e destino dos resíduos.....	17
4	Resultados e Discussão.....	18
4.1	Obtenção dos extratos	18
4.2	Avaliação dos extratos	20
4.2.1	Determinação do conteúdo fenólico pelo método do reagente de Folin-Ciocalteu	20
4.2.2	Determinação da capacidade antioxidante pelo DPPH	21
4.2.3	Ensaio antimicrobianos.....	22
4.3	Produção do iogurte	24
4.4	Testes de estabilidade.....	25
4.5	Avaliação do produto final	31
5	Conclusões.....	33
6	Avaliação do trabalho realizado	35
6.1	Objetivos Realizados	35
6.2	Trabalho futuro	35
6.3	Apreciação Final.....	36
7	Referências.....	37
	Apêndice A – Produção dos extratos	46
	Apêndice B – Avaliação dos extratos.....	50
	Apêndice C – Avaliação dos iogurtes.....	57
	Apêndice D - Questionário	63

Lista de Figuras

Figura 2.1.1.1. Exemplos de compostos utilizados como conservantes na indústria, e respectiva classificação.	5
Figura 2.2.1 Distribuição da fração de desperdício alimentar gerado pela indústria. (Adaptado de Marić <i>et al.</i> , 2018).	6
Figura 2.2.2 Fração de subprodutos gerados pela indústria durante o processamento da maçã, papaia e ananás. Adaptado de (Ayala-Zavala <i>et al.</i> , 2010).	6
Figura 4.3.1 Fotografia dos iogurtes desenvolvidos e respectiva composição.	25
Figura 4.4.1 Resultados obtidos para o valor de pH dos diferentes iogurtes, nos dias 1 e 14.	25
Figura 4.4.2 Resultados obtidos para a sinérese (%) dos diferentes iogurtes, nos dias 1 e 14.	26
Figura 4.4.3 Resultados obtidos para a viscosidade aparente (mPas^{-1}) dos iogurtes, em função da taxa de deformação (s^{-1}) nos dias 1 (A) e 14 (B), e variação de viscosidade aparente com temperatura crescente (C) e temperatura decrescente (D), no dia 1.	28
Figura 4.4.4 Conteúdo fenólico total dos iogurtes ($\text{mg}_{\text{GAE}} \text{g}^{-1}_{\text{iogurte}}$), para os iogurtes, nos dias 1 e 14.	29
Figura 4.4.5 Percentagem de inibição do DPPH, para 500 mg mL^{-1} de iogurte, nos dias 1 e 14.	29
Figura A.2.1 Fotografia do forno de vidro usado no processo de secagem da casca de abóbora.	46
Figura A.2.2 Fotografias das cascas de melão (A) e de abóbora (B), após a secagem.	47
Figura A.2.3. Fotografia da montagem da extração com recurso ao Soxhlet (A) e da evaporação do solvente com o evaporador rotativo (B).	48
Figura B.1.1. Esquema da reação com o reagente de Folin-Ciocalteu.	50
Figura B.1.2. Representação da reta de calibração da absorvância das amostras de ácido gálico, em função da concentração (mg L^{-1}).	51
Figura B.2.1. Representação esquemática da reação de redução do DPPH.	52
Figura B.2.2. Esquema da microplaca e respectiva legenda.	52
Figura B.2.3. Representação da reta de calibração da percentagem de inibição de DPPH, em função da concentração (mg L^{-1}), para o ECM e para o ECA.	54

Figura B.2.4. Representação da reta de calibração da percentagem de inibição de DPPH, em função da concentração (mgL^{-1}), para a solução de trolox.	55
Figura C.1.1. Fotografia dos equipamentos utilizados nos ensaios de estabilidade, o reómetro (A) e o medidor de pH (B).....	57
Figura C.1.2. Resultados para a viscosidade aparente (mPas^{-1}) em função da taxa de deformação (s^{-1}), em escala logarítmica, para os iogurtes CN (A), CP (B), M1 (C), M2 (D), para os dias 1 e 14.....	58
Figura C.1.3. Resultados para a viscosidade aparente (mPas^{-1}) em função da taxa de deformação (s^{-1}), em escala logarítmica, para os iogurtes AB1 (E), AB2 (F), MIXA (G), MIXAP (H), para os dias 1 e 14.....	59
Figura C.1.4 Fotografia dos meios LSA (A) e RBC (B) inoculados com os iogurtes, no dia 1. ..	62
Figura C.1.5 Fotografia dos meios LSA (A) e RBC (B) inoculados com os iogurtes, no dia 14. ..	62
Figura D.1 Distribuição da amostra por base de género (A) e idade (B).....	63
Figura D.2 Respostas às perguntas 3 e 4, relativas à preocupação dos inquiridos sobre conservantes de origem sintética.....	63
Figura D.3 Respostas às perguntas 5 e 6, relativamente ao consumo de iogurte dos inquiridos. ..	63
Figura D.4 Resposta à pergunta 7, relativamente à importância do conservante de origem natural.	64
Figura D.5 Resposta à pergunta 8, relativamente à disponibilidade dos inquiridos em experimentar os iogurtes e a responder a perguntas sobre os mesmos.	64
Figura D.6 Respostas relativas às características dos iogurtes produzidos, cor (A), textura (B), odor (C) e sabor (D).	64
Figura D.7 Resposta à pergunta 38, sobre a possibilidade de aquisição de um dos iogurtes.....	65

Lista de Tabelas

Tabela 2.2.1 Exemplos de aplicações de extratos de subprodutos de frutas ou vegetais, na área alimentar, encontrados na literatura.	7
Tabela 2.2.2.1 Compostos bioativos normalmente presentes em frutas e legumes, e respetiva classificação.	9
Tabela 2.2.4.1 Testes de estabilidade do iogurte desenvolvidos, e respetivo racional.	11
Tabela 3.6.1 Composição dos iogurtes produzidos.	15
Tabela 4.1.1 Condições de preparação de extratos de diversas cascas, e respetivos rendimentos, obtidos no presente estudo e referidos na literatura.	19
Tabela 4.2.1.1 Conteúdo fenólico dos extratos de casca de melão e abóbora ($\text{mg}_{\text{GAE}}\text{g}^{-1}_{\text{extrato}}$) obtidos no presente estudo e mencionados na literatura.	20
Tabela 4.2.2.1 Resultados obtidos para a capacidade antioxidante dos extratos no presente estudo, em percentagem de inibição do DPPH (%), TEAC ($\mu\text{mol}_{\text{Trolox}}\text{g}^{-1}_{\text{extrato}}$) e IC_{50} (mgmL^{-1}) e na literatura.	21
Tabela 4.2.3.1 Resultados médios obtidos para os halos de inibição dos extratos e controlos (cm), a concentrações 500 mgmL^{-1} e 1000 mgmL^{-1} e controlos, após 24h de incubação.	23
Tabela 4.4.1 Resultados para os halos de inibição obtidos (cm), para os iogurtes, nos dias 1 e 14.	30
Tabela A.2.1. Rendimentos (%) obtidos na extração de cascas de melão.	49
Tabela A.2.2. Rendimentos (%) obtidos na extração de cascas de abóbora.	49
Tabela B.1.1. Volume de reagente (μL) utilizado na preparação das soluções do ensaio Folin-Ciocalteu.	50
Tabela B.2.1. Percentagem de inibição do DPPH (%) cada concentração de extrato.	53
Tabela B.3.1. Diâmetro dos halos de inibição obtidos (cm), para as bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> , e para concentrações de 500 mgL^{-1} e 1000 mgL^{-1} de extrato.	56
Tabela C.1.1 Valores de pH e sinérese (%) obtidos para os iogurtes, para os dias 1 e 14.	57
Tabela C.1.2. Índice de consistência (mPas^n) e índice do comportamento do fluido para os iogurtes, nos dias 1 e 14.	60

Tabela C.1.3 Valores dos halos de inibição (cm) para os iogurtes, para as duas bactérias estudadas, nos dias 1 e 14.....61

Notação e Glossário

P	Pressão	Pa
T	Temperatura	°C
t	Tempo	s
m	Massa	g
MM	Massa molar	g mol ⁻¹
n	Índice de potência	
K	Índice de consistência	m Pas ⁻¹

Letras gregas

λ	Comprimento de onda	nm
σ	Desvio padrão	
η	Viscosidade	m Pas ⁻¹
$\dot{\gamma}$	Taxa de deformação	s ⁻¹

Lista de Siglas

BHA	Hidroxianisol butilado
CBAs	Compostos BioAtivos
CN	Controlo negativo
CP	Controlo positivo
dm	Matéria seca
ECM	Extrato de casca de melão
ECA	Extrato de casca de abóbora
ESL	Extração sólido-líquido
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
GAE	Equivalentes de ácido gálico
IC ₅₀	Concentração inibitória média
IDFA	<i>International Dairy Foods Association</i>
IGD	<i>Consumers Good Insights</i>
LSA	Caldo lauril sulfato
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
RBC	Ágar rosa bengala com cloranfenicol
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente de Trolox

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

A qualidade da alimentação é um tema ao qual a sociedade tem dado cada vez mais importância nos últimos anos. A procura dos consumidores por alimentos saudáveis, pouco processados e de baixo conteúdo em compostos de origem sintética, como são exemplos alguns dos aditivos alimentares, aumentou exponencialmente, o que levou a indústria alimentar a procurar alternativas de origem natural para estas substâncias essenciais.

Uma classe crucial de aditivos alimentares são os conservantes, pois permitem aos alimentos manter as suas qualidades e propriedades ao longo do tempo de armazenamento, prologando o período em que os produtos podem ser armazenados para consumo. Este fator tornou-se extremamente importante, com o aumento da globalização, em que um alimento pode não ser necessariamente consumido geograficamente próximo de onde foi produzido, podendo chegar a consumidores em qualquer parte do mundo.

Uma classe de alimentos cuja manutenção da qualidade ao longo do tempo depende da adição de conservantes são os lacticínios. O leite e os seus derivados são ricos em vitaminas e nutrientes que os tornam um excelente meio de propagação de patogénicos e os tornam sensíveis à deterioração (Zajác *et al.*, 2016). Um dos derivados do leite mais bem conhecido é o iogurte, produto da fermentação do leite pelas bactérias *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. O iogurte é muito consumido em todo o mundo pelos seus benefícios para a saúde, conveniência e versatilidade de sabores.

Os conservantes atualmente mais utilizados na produção do iogurte são de origem sintética: o ácido sórbico (E200) e os respetivos sais, como o sorbato de potássio (E202), o sorbato de sódio (E201) e o sorbato de cálcio (E203) (Carocho *et al.*, 2014). No entanto, a preferência por conservantes de origem natural também se refletiu neste produto, pelo que se tornou do interesse da indústria encontrar alternativas de origem natural a estes aditivos.

Paralelamente, tem vindo a aumentar a preocupação com o crescente acumular de desperdícios alimentares, que afetam não só a economia como ambiente e os seres vivos. Um exemplo é a grande libertação de gases com efeito de estufa durante a decomposição da matéria orgânica por microrganismos (Morales-Castro *et al.*, 2021). Felizmente, os subprodutos dos legumes e frutas, como as cascas e as sementes, apresentam elevado potencial de reutilização ao

serem uma fonte de compostos bioativos de grande interesse por possuírem características benéficas para a saúde e também poderem atuar de maneira semelhante aos conservantes previamente mencionados.

Dois subprodutos que se revelam ricos em compostos bioativos de interesse são as cascas de melão e de abóbora (Mallek-Ayadi *et al.*, 2017)(Sharma & Bhat, 2021). Estes subprodutos são produzidos em grande quantidade em Portugal pois, por um lado, ambos os frutos são característicos do clima mediterrâneo e, por outro, quando são consumidos, a casca é retirada e descartada. As cascas de melão e de abóbora são ricas em compostos fenólicos, que se destacam pela sua capacidade antioxidante e antimicrobiana, e em carotenóides, que possuem capacidade antioxidante e antiproliferativa, características estas semelhantes às dos conservantes de origem sintética. Adicionalmente, são também ricas em compostos de alto valor nutricional como vitaminas, proteínas e fibras.

Assim, com o objetivo de reduzir o impacto ambiental e económico destes subprodutos, aplicando o modelo de economia circular, procurou-se incorporar extratos das cascas de abóbora e melão na produção de iogurtes, acrescentando assim valor nutricional e evitando ou diminuindo a utilização de conservantes de origem sintética.

Deste modo, o trabalho, realizado no âmbito da dissertação, teve como principal objetivo o desenvolvimento de um produto de valor acrescentado e ambientalmente sustentável, nomeadamente um iogurte com extratos de cascas de abóbora e melão incorporados. Para isso foi necessária a valorização destes subprodutos agrícolas, através da produção de extratos ricos nos compostos de interesse, como são exemplos os compostos fenólicos e os carotenóides. Foram avaliadas as propriedades dos extratos quanto à sua capacidade antioxidante e antimicrobiana de modo a averiguar se seriam candidatos fortes a substituir os conservantes de origem sintética. Finalmente os extratos foram incorporados no iogurte e foram realizados testes de estabilidade, de modo a avaliar se teriam as propriedades desejadas.

1.2 Organização da Dissertação

A dissertação encontra-se dividida em seis capítulos. O primeiro capítulo é referente à “Introdução”, com o enquadramento do tema e apresentação geral do projeto. O segundo capítulo, denominado de “Contexto e Estado da Arte”, apresenta informações gerais sobre o tema, como a recente procura por aditivos alimentares de origem natural e a problemática da acumulação dos subprodutos agrícolas, onde é mencionada a sua composição em compostos bioativos de interesse. Posteriormente é realçado o potencial destes compostos como substitutos para conservantes de

origem sintética, tendo como produto-alvo o iogurte. O terceiro capítulo refere-se aos “Materiais e Métodos”, onde são descritos os equipamentos e processos desenvolvidos durante a realização do projeto. No quarto capítulo, “Resultados e Discussão”, os resultados são descritos e discutidos. Os capítulos cinco e seis, referem-se às conclusões e sugestões para trabalho futuro, respectivamente. Finalmente são mencionadas as referências e em “Apêndice” encontram-se informações adicionais sobre determinados conteúdos mencionados nesta dissertação.

2 Contexto e Estado da Arte

2.1 Indústria alimentar

A indústria alimentar é, desde sempre, uma das indústrias com maior importância, englobando o percurso dos alimentos desde a sua produção até chegarem ao prato dos consumidores (Sadiku *et al.*, 2019). Ao longo dos anos, esta indústria tem vindo a alterar-se de acordo com as necessidades da população. Durante décadas, devido a fatores sociais e económicos, a qualidade dos alimentos não foi uma prioridade tendo-se desenvolvido diversos aditivos alimentares que satisfaziam a crescente procura dos consumidores por alimentos “prontos a consumir”, rápidos e convenientes (Mesías *et al.*, 2021). No entanto, nos últimos anos, tem-se verificado o fenómeno oposto. A preocupação dos consumidores com o efeito que a qualidade dos alimentos que consomem tem na sua saúde tem vindo a aumentar cada vez mais, verificando-se uma maior preferência por alimentos saudáveis, naturais e sem aditivos.

2.1.1 Aditivos alimentares

Os aditivos alimentares são definidos como substâncias sintéticas ou naturais, normalmente não utilizadas como ingrediente naquele alimento, e que são adicionadas intencionalmente com um objetivo tecnológico ou sensorial. É exemplo de um objetivo tecnológico o aumento do tempo de armazenamento, evitando a degradação do alimento por bactérias ou pelo oxigénio e exemplo de um objetivo sensorial a melhoria do seu sabor ou cor (Carocho *et al.*, 2015; Miao *et al.*, 2020). Assim, os aditivos podem ter uma ou mais funções quando adicionados a um alimento, como conservantes, aditivos nutritivos, corantes, aromatizantes, entre outros (Carocho *et al.*, 2015).

Os conservantes podem ser divididos em duas classes, I e II (Kamala Kumari *et al.*, 2019). A primeira, representa os conservantes naturais, que se encontram naturalmente nos alimentos, e podem ser utilizados sem restrições. A segunda representa os conservantes produzidos pela mão humana, e a quantidade a ser utilizada está restringida a um intervalo e a um alimento específico. Dentro da classe II dos conservantes artificiais, estes podem dividir-se em antimicrobianos, que inibem o crescimento de bactérias e de bolor nos alimentos armazenados, e os antioxidantes, que previnem a oxidação dos mesmos (Sharif *et al.*, 2017). Exemplos dos conservantes mais utilizados, e respetiva classificação, encontram-se no esquema apresentado na Figura 2.1.1.1.

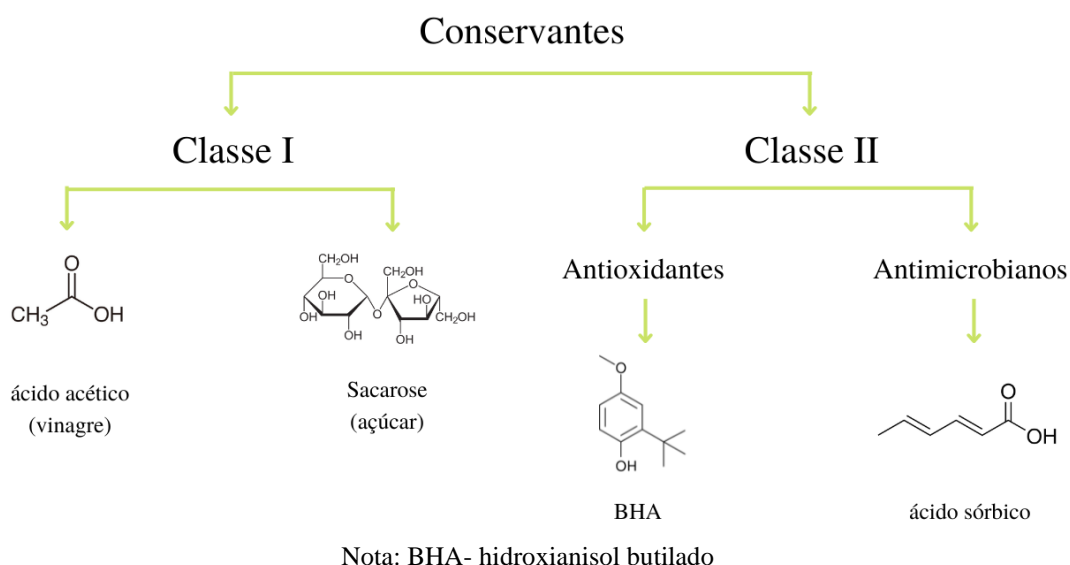


Figura 2.1.1.1. Exemplos de compostos utilizados como conservantes na indústria, e respetiva classificação.

Os conservantes da classe II são muito utilizados pela sua conveniência, eficácia e versatilidade (Abusaloua *et al.*, 2019). No entanto, foram desenvolvidos estudos nos quais se demonstrou que um consumo excessivo de aditivos alimentares sintéticos pode estar relacionado com reações adversas a nível respiratório, gastrointestinal e neurológico (Carocho *et al.*, 2014). Assim, os compostos naturais candidatos a substituir este tipo de conservantes têm ganhado cada vez mais importância. De facto, as frutas, legumes e plantas contêm compostos com atividade biológica, denominados de Compostos BioAtivos (CBAs), com potencial para os substituir (Leichtweis *et al.*, 2021). No entanto, face à procura deste bem essencial, não faria sentido produzir aditivos diretamente a partir das frutas e legumes cujo fim seria para alimentação, pelo que o foco recaiu sobre os subprodutos agrícolas, como as sementes e as cascas. Isto porque, por um lado, os subprodutos agrícolas são produzidos em grandes quantidades e, portanto, o seu reaproveitamento permitiria mitigar os efeitos ambientais e económicos nefastos da sua acumulação e, por outro lado, os subprodutos agrícolas são ricos nos CBAs, que possuem propriedades de interesse para diversas áreas da indústria.

2.2 Subprodutos agrícolas

Na União Europeia, cerca de 100 milhões de toneladas de desperdício e subprodutos alimentares são gerados anualmente. A distribuição da fração de desperdício alimentar gerado por cada indústria encontra-se representada na Figura 2.2.1.

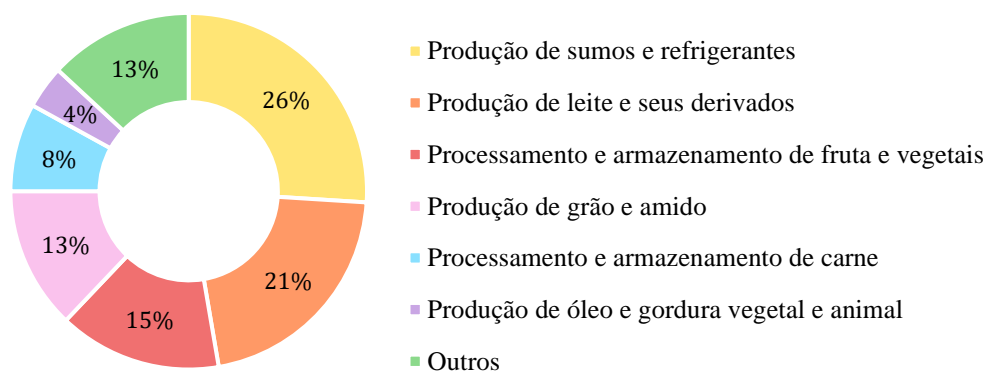


Figura 2.2.1 Distribuição da fração de desperdício alimentar gerado pela indústria. (Adaptado de Marić *et al.*, 2018).

É possível aferir que cerca de 40 % dos desperdícios são gerados por indústrias envolvidas na manipulação de frutas e legumes. Este valor não é surpreendente, tendo em conta que os subprodutos gerados por esta classe de alimentos podem chegar a mais de 50 % do seu volume inicial (Ayala-Zavala *et al.*, 2010). Na Figura 2.2.2, pode observar-se a percentagem de fruta utilizada no produto final e percentagem de subprodutos gerada durante o seu processamento, para a maçã, papaia e ananás.

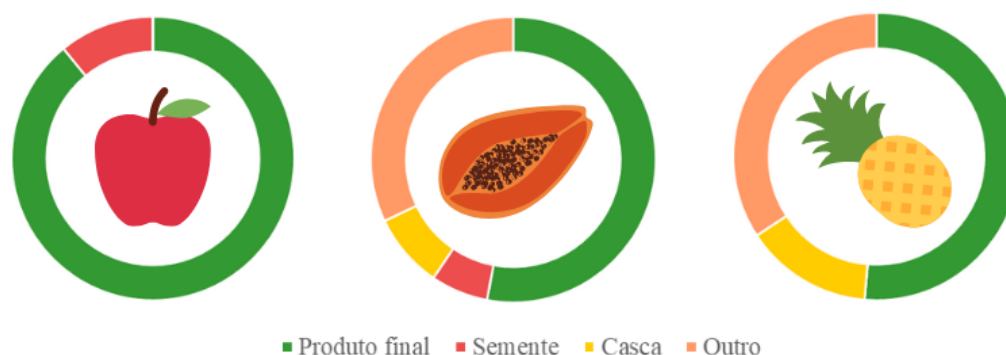


Figura 2.2.2 Fração de subprodutos gerados pela indústria durante o processamento da maçã, papaia e ananás. Adaptado de (Ayala-Zavala *et al.*, 2010).

É importante salientar que estes subprodutos não são apenas gerados pela indústria, mas também no quotidiano, durante a preparação de refeições. Anualmente, 500 milhões de toneladas de cascas de frutas e vegetais são produzidos mundialmente (Ganji *et al.*, 2019). Esta quantidade de subprodutos tem vindo a aumentar, com o recente interesse dos consumidores por alimentos não processados. Segundo a *Consumer Goods Insights* (IGD) este fenómeno foi catalisado pela pandemia de Covid-19, que levou cerca de $\frac{3}{4}$ dos consumidores a alterar os seus hábitos alimentares durante este período, com mais de metade a revelar que começaram a incluir mais frutas e legumes na sua alimentação.

Uma parte destes subprodutos são incorporados na confecção de outros alimentos, utilizados como ração para animais, compostados, enterrados ou queimados, na tentativa de reduzir o impacto da sua acumulação. No entanto, os subprodutos são produzidos a uma velocidade superior àquela em que atualmente são incorporados, o que resulta na sua inevitável acumulação, principalmente em aterros.

Esta acumulação tem graves impactos ambientais, pois os ecossistemas não se encontram preparados para subitamente englobarem grandes quantidades de subprodutos alimentares, que têm pouca estabilidade biológica, alta concentração de compostos orgânicos e baixa estabilidade oxidativa (Bharat Helkar *et al.*, 2016). E a sua decomposição, através de microrganismos, pode não só perturbar o equilíbrio ambiental como afetar a saúde humana. De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) o desperdício alimentar é a segunda maior causa de emissão de gases com efeito de estufa, nomeadamente durante a decomposição da matéria orgânica nos aterros. Em termos económicos, a produção de subprodutos afeta desde o rendimento dos agricultores às despesas dos consumidores, pelo que é do interesse comum que os desperdícios alimentares produzidos sejam reaproveitados e reaplicados (Morales-Castro *et al.*, 2021).

Com o aumento deste problema, foram desenvolvidos estudos que confirmam a aplicabilidade dos compostos extraídos a partir de alguns subprodutos agrícolas como aditivos alimentares. Alguns exemplos dos subprodutos e sua possível aplicação encontram-se resumidos na Tabela 2.2.1.

Tabela 2.2.1 Exemplos de aplicações de extratos de subprodutos de frutas ou vegetais, na área alimentar, encontrados na literatura.

Alimento	Subproduto	Aplicação	Referência
Abacate	Casca	Redução da formação e oxidação de compostos nocivos resultantes da cozedura	(Trujillo-Mayol <i>et al.</i> , 2021)
Uva	Pele e sementes	Melhoria natural das propriedades organoléticas dos rebuçados	(Altnok <i>et al.</i> , 2020)
Limão	Bagaço	Melhoria da qualidade de bolachas, com o objetivo de substituir antioxidantes sintéticos por naturais	(Imeneo <i>et al.</i> , 2021)
Romã	Casca	Utilização com sucesso do extrato como um conservante natural para o queijo magro Kalari, que resultou em melhorias na manutenção da qualidade durante o tempo de armazenamento	(Mahajan <i>et al.</i> , 2015)
Cebola	Casca	Aumento do tempo de armazenamento do pão de mistura e aumento do seu conteúdo fenólico	(Sagar & Pareek, 2021)

Alimento	Subproduto	Aplicação	Referência
Azeitona	Bagaçó	Fortificação de massa de trigo, aumentando o conteúdo fenólico, capacidade antioxidante e quantidade de fibras dietéticas. Aumento da absorção de água e decréscimo do tempo ótimo de cozedura	(Simonato <i>et al.</i> , 2019)
Ananás	Casca	Melhoria das características físico-química, texturais, reológicas e microestruturais do iogurte fortificado quando armazenado durante 28 dias	(Sah <i>et al.</i> , 2016)

2.2.1 Compostos de interesse nos subprodutos

A possibilidade de aplicação dos compostos presentes nos subprodutos com o objetivo de substituir os aditivos alimentares já existentes, deve-se ao facto de alguns apresentarem CBAs com propriedades semelhantes. Os CBAs definem-se como nutrientes ou não-nutrientes que produzem efeitos fisiológicos para além das suas propriedades nutricionais clássicas (Cazarin *et al.*, 2022). Na Tabela 2.2.2.1 encontram-se organizados, pela sua classificação, os CBAs mais encontrados em frutas e legumes, assim como algumas das suas propriedades.

Alguns destes compostos são de extrema importância para as plantas, e estas produzem-nos com o intuito de se protegerem contra agressões exteriores. Aos CBAs produzidos pelas plantas com o intuito de proteção dá-se o nome de fitoquímicos. Por exemplo, alguns dos compostos fenólicos presentes em cascas funcionam como proteção contra insetos e microrganismos (Ganji *et al.*, 2019), os carotenóides como pigmentos e os terpenóides como antibacterianos (Andrade *et al.*, 2019).

2.2.2 Exemplos de subprodutos de origem nacional

Graças ao clima mediterrâneo, Portugal é rico em diversas frutas e legumes, sendo que os produtos mais conhecidos são a maçã, pêra, laranja, melão, banana, tomate e abóbora.

Anualmente, produzem-se cerca de 90 mil toneladas de melão em Portugal, divididas por 4000 hectares de área de cultivo, começando a sua comercialização em meados de agosto e terminando em meados de outubro (*Produção e Comercialização de Melão / MarketingAgricola.Pt*, n.d.). As zonas de maior importância de produção são no Sul, como Almeirim, Beja, Moura e Algarve. No que respeita à abóbora, a zona Oeste de Portugal, onde se produzem anualmente 44 mil toneladas, tem conquistado cada vez mais relevância na produção nacional (*Abóbora Butternut a Ganhar Terreno - Agroportal*, n.d.). A abóbora-menina e a

Tabela 2.2.2.1 Compostos bioativos normalmente presentes em frutas e legumes, e respetiva classificação.

Classe	Propriedades	Subclasses	Substâncias	Origem
Compostos fenólicos	Antioxidante, antimicrobiano, conservante, anticancerígeno, anti-inflamatório, anti-diabético, anti-mutagénico	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxicinâmicos, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido <i>m</i> -cumárico, ácido gálico, ácido rosmarínico, ácido salicílico, ácido cinâmico	Melão, mirtilo, kivi, ameixa, cereja, maçã, laranja
		Estilbenos	Resveratrol, <i>piceatannol</i> , adstringina, pterostilbeno	Uva, amora, amendoim, açaí, arando
		Lignanas	Matairesinol, pinoresinol, lariciresinol, virolina	Linhaça, pêra, damasco, aveia, feijão, mirtilo, framboesa, amora, café, semente de sésamo, couve
		Flavonóides	Quercetina, <i>kaempferol</i> , naringenina, catequina, cianidina, apigenina, genisteína, daidzeína, hesperetina	Limão, uva, mirtilo, framboesa, maçã, chá preto, pimento
		Taninos	Epicatequina, ácidos taninos, galotaninos, elagitaninas	Morango, uva, mirtilo, maçã, pêsego, manjeriço, alecrim
Carotenóides	Antioxidante Antiproliferativa	-	Luteína, α -caroteno, β -caroteno, α -tocoferol, γ -tocoferol, licopeno, zeaxantina, β -criptoxantina, astaxantina	Abóbora, cenoura, brócolo, tangerina, feijão, espinafre, melão, laranja, clementina
Tocoferóis	Antioxidante Anti-inflamatório	-	α -tocoferol, γ -tocoferol, β -tocoferol	Soja, amêndoa, amendoim, sésamo
Glucosinolatos	Antioxidante Antimicrobiana	-	Glucorafanina, Glucobrassicina, neoglucobrassicina	Brócolo, repolho, couve-flor, mostarda
Terpenóides	Antibacteriana Antioxidante	-	Citral, mentol, cânfora, limoneno, mirceno, α -pineno, linalol, β -carofileno, nerolidol, oleuropeína, fitol	Laranja, tangerina, manga, maçã, azeitona

Fontes:(Vasantha Rupasinghe *et al.*, 2014);(Hao *et al.*, 2015); (Mathur *et al.*, 2015); (Lamy *et al.*, 2016); (Padmanabhan *et al.*, 2016); (Panche *et al.*, 2016); (Possenti *et al.*, 2016); (Zakynthinos & Varzakas, 2016);(Bischoff, 2016);(Wang *et al.*, 2019);(Câmara *et al.*, 2021); (Kaderides *et al.*, 2021);(Masyita *et al.*, 2022);(Lignans | Linus Pauling Institute | Oregon State University, n.d.); (Phenolic Acid: Benefits and Where to Get Them in Your Diet, n.d.);(Carotenoids | Linus Pauling Institute | Oregon State University, n.d.).

abóbora-manteiga são as espécies de maior predominância, sendo a primeira associada à época de outono/ inverno e a segunda à época de primavera/verão. Ambas as cascas do melão e abóbora são ricas em CBAs. A casca de melão caracteriza-se pela concentração de compostos fenólicos, em que se destacam os ácidos fenólicos, nomeadamente o ácido gálico, ácido vanílico e ácido *m*-cumárico e os flavonóides, como a apigenina e naringenina (Mallek-Ayadi *et al.*, 2017). A casca de abóbora é rica em carotenóides como o α -caroteno, β -caroteno, zeaxantina, luteína e γ -tocoferol, tendo também alguns compostos fenólicos na sua constituição como o ácido gálico e ácido cafeico.(Kulczyński *et al.*, 2020)(Kulczynski & Gramza-Michałowska, 2019). A casca de melão também apresenta, por sua vez, alguns carotenóides, como o α -caroteno e β -caroteno (Amaro *et al.*, 2015). Outro composto a referir é a pectina, um polissacarídeo complexo (Raji *et al.*, 2017). Para além dos compostos bioativos, as cascas de melão e abóbora também apresentam compostos de alto valor nutricional, como vitaminas, proteínas e fibras (M. A. Silva *et al.*, 2020).

Estes CBAs fazem das cascas de melão e abóbora bons candidatos a subprodutos a ser estudados como tendo capacidade antioxidante e antimicrobiana, capazes de substituir os conservantes sintéticos. Dentro dos potenciais produtos a serem incorporados, destacam-se o leite e os seus derivados por serem ricos em vitaminas e nutrientes que os tornam um bom meio de desenvolvimento de patogénicos e os tornam sensíveis à deterioração (Zajác *et al.*, 2016).

2.2.3 Iogurte

O iogurte é o produto láteo fermentado mais reconhecido em todo o mundo por ser um alimento saudável e versátil (Vijaya Kumar *et al.*, 2015). É produzido através da fermentação, pelas bactérias *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, de um açúcar presente no leite, a lactose. Para este processo ocorrer, é necessário o meio estar a 40 °C. Durante este processo, ácido láctico é libertado, o que diminui o pH do meio. A diminuição do pH até ao ponto isoelectrico das proteínas do leite, as caseínas, provoca a sua precipitação, o que permite ao iogurte ter a sua textura característica (González-García *et al.*, 2012). A partir do momento em que o iogurte se encontra com a textura pretendida, é imperativo parar o processo de fermentação, diminuindo a temperatura, que irá desacelerar o crescimento das bactérias. O iogurte é, na base, pobre em CBAs, daí interesse na incorporação de outros compostos, para permitir a fortificação deste alimento.

Um dos conservantes sintéticos mais utilizados nos alimentos em geral e especificamente no iogurte é o ácido sórbico, E200 (na União Europeia todos os aditivos são classificados com a letra E, seguida por um número específico). Este é um reconhecido antimicrobiano cuja concentração se encontra limitada a um máximo de 1000 mg L⁻¹ nos alimentos à base de leite fermentado

(Regulamento (UE) N°1129/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 11 de Novembro de 2011 relativo a aditivos alimentares). Este composto é a molécula base (forma protonada) de outros três conservantes antimicrobianos, o sorbato de sódio (E201), o sorbato de potássio (E202) e o sorbato de cálcio (E203) (Carocho *et al.*, 2014).

À semelhança dos restantes conservantes, nos últimos anos o ácido sórbico tem vindo a ser alvo de avaliações de segurança para consumo. Estudos indicam que o ácido sórbico pode ser responsável por reações cutâneas adversas (Mandal, 2019) e que pode reagir com outros compostos ou conservantes à base de nitritos, formando compostos mutagénicos, apesar de este processo ser raro (Younes *et al.*, 2019).

2.2.4 Estabilidade do produto

Durante a fase inicial do desenvolvimento de um produto são realizados testes de estabilidade de modo a avaliar se os alimentos mantêm as suas propriedades físicas, químicas e microbiológicas durante o tempo de armazenamento. Estes testes visam determinar alguns fatores como o tempo de vida do produto nas prateleiras e as condições de armazenamento ótimas. Adicionalmente, é importante verificar se as propriedades do produto são bem aceites pelos consumidores, o que garante rentabilidade económica. Para os iogurtes com CBAs incorporados, são especialmente importantes testes que verifiquem as capacidades antioxidantes e antimicrobianas dos mesmos, quando comparadas a um conservante sintético. Exemplos dos testes desenvolvidos e a razão pelo qual foram realizados encontram-se na Tabela 2.2.4.1.

Tabela 2.2.4.1 Testes de estabilidade do iogurte desenvolvidos, e respetivo racional.

Teste	Racional	
Físico-químicos	pH	Indicador do crescimento de bactérias e monitorização da produção de ácido láctico
	Sinérese	Formação do soro no topo do iogurte que provoca um efeito indesejado no consumidor
	Viscosidade	Fator de influência na aceitação do produto por parte do consumidor
Conteúdo fenólico total	-	Influência nas propriedades sensoriais do iogurte e na sua capacidade antioxidante
Capacidade antioxidante	-	Permite combater a oxidação do iogurte e melhora a perceção do produto por parte dos consumidores
Antimicrobiano	-	Verificação da contaminação do iogurte, assim como das suas propriedades antimicrobianas
Análise sensorial	-	Determinação da opinião dos consumidores sobre propriedades físicas do iogurte, como o sabor, textura, odor e cor

3 Materiais e Métodos

3.1 Reagentes

As cascas de melão utilizadas foram obtidas num supermercado local, sendo da espécie *Cucumis melo*. As cascas de abóbora foram obtidas a partir de abóboras cultivadas em Braga, Portugal, da espécie *Curcubita moschata*. Os solventes de extração foram etanol puro (Ref. 1.02371.1000, C₂H₆O, CAS 64-17-5) a partir de VWR (Fontenay-sous-Bois, França). Para determinar o conteúdo fenólico total recorreu-se ao Reagente de Folin-Ciocalteu (Ref. 47641) e carbonato de sódio (Ref. 222321, Na₂CO₃, CAS 497-19-8), obtidos através de Sigma Aldrich (St.Louis, MO, EUA). Para a atividade antioxidante utilizou-se o DPPH (Ref. D9132, C₁₈H₁₂N₅O₆, CAS 1898-66-4) e o Trolox (Ref. 238813, C₁₄H₁₈O₄, CAS 53188-07-1) e, para a atividade antimicrobiana, utilizou-se o ácido sórbico (Ref. S1626, C₆H₈O₂, CAS 110-44-1), sendo todos obtidos através de Sigma Aldrich (St.Louis, MO, EUA). Os reagentes utilizados para produzir o iogurte foram o Iogurte Natural Inteiro Probiótico Sólido e o Leite UHT Meio Gordo, adquiridos através de um supermercado local. A água utilizada foi desionizada e ultrapura com um sistema de purificação de água Millipore™ (Massachusetts, EUA) com resistência elétrica de 18,2 Ω.

3.2 Materiais e equipamento

A liofilização das cascas de melão ocorreu num liofilizador (SP Scientific, NY, EUA). As cascas de abóbora foram secas num forno de secagem de vidro (Buchi GKR-51). As pesagens foram realizadas numa balança de escala analítica Mettler Toledo AG245 (Columbus, OH, EUA). Para as extrações foi utilizada uma manta de aquecimento (Fisatom, SP, Brasil) e para a evaporação do solvente de extração recorreu-se a um sistema de evaporação (Buchi R-200, Flaiwil, Suíça). Na produção dos iogurtes utilizou-se um banho-maria (VWR, 1224-2, França). Para determinar o conteúdo fenólico total procedeu-se à medição das absorvâncias num espectrofotómetro UV-Vis V-530 (Jasco, OK, EUA). Para os ensaios da capacidade antioxidante utilizou-se um leitor de multiplacas (Synergy, HT, Biotek, EUA) para medir a absorvância das amostras. Para os ensaios de estabilidade utilizou-se um medidor de pH (XS Instruments, Capri, Itália), uma centrífuga (Centrifuge 5424, eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e um reómetro (MCR 92, Graz, Áustria).

3.3 Obtenção e pré-tratamento das cascas

As cascas de melão e de abóbora foram primeiramente limpas de modo a retirar a polpa que ainda estivesse na casca. De seguida, partes que apresentavam sinais de decomposição ou imperfeições foram retiradas e as cascas foram posteriormente lavadas diversas vezes com água destilada, para lhes serem retiradas impurezas. Após serem lavadas, as cascas de melão foram liofilizadas durante 3 dias, a -90°C e a 1,3 Pa. As cascas da abóbora, após a lavagem, começaram por secar durante 15 horas num forno de secagem de vidro, cuja representação se encontra esquematizada na Figura A.2.1, no Apêndice A, a 70°C e a vácuo, acabando de secar numa estufa de secagem, a 60°C , à pressão ambiente. Na Figura A.2.2, do Apêndice A, encontram-se imagens das cascas após a secagem. Ambas as amostras foram separadamente moídas, com um moedor de grãos de café. Com o objetivo de verificar a homogeneidade do tamanho das partículas da amostra, estas foram peneiradas, tendo-se obtido uma amostra de casca de melão e de abóbora na qual aproximadamente 75 % dos grãos tinham um tamanho inferior a 50 mesh e 100 % dos grãos a 16 mesh.

3.4 Obtenção dos extratos

A extração dos compostos das cascas de melão iniciou-se na preparação de uma solução heterogénea de razão amostra-solvente de 1:20 (m/V) de 2,5 g de cascas de melão moídas para 50 mL de solvente de extração, etanol.

A solução de casca de melão foi sujeita a uma primeira extração sólido-líquido (ESL) assistida por ultrassons, durante 15 minutos e, posteriormente, procedeu-se a uma filtração a vácuo, após o qual o filtrado foi colocado num balão de fundo redondo de 100 mL e o resíduo foi colocado no interior de um cartuxo de papel de filtro.

Relativamente às cascas de abóbora, 2,5 g foram diretamente colocadas no cartuxo de papel de filtro, e 50 mL de etanol no balão de 100 mL, numa proporção de amostra-solvente de 1:20 (m/V), à semelhança da casca de melão.

Para ambos os extratos foi realizada a montagem do equipamento, colocando o Soxhlet em posição de refluxo e colocando reguladores de ebulição dentro do balão com solvente.

As extrações foram realizadas durante 140 min para a casca de melão e 120 minutos para a casca de abóbora, a 80°C , ao fim das quais o etanol foi removido num evaporador rotativo, com o banho a cerca de 40°C e a 5800 Pa. A representação das montagens do Soxhlet e do evaporador rotativo encontram-se na Figura A.2.2 do Apêndice A. Antes que ocorresse a evaporação total do

etanol, o conteúdo dentro dos balões foi transferido para matrizes em forma de pês, previamente pesados. Para permitir uma evaporação mais completa, os extratos foram posteriormente sujeitos a uma corrente de azoto, até ao seu peso se manter constante. A massa final foi pesada, e os extratos armazenados. Na Figura A.2.3, do Apêndice A, encontram-se imagens das montagens do extrator Soxhlet e do evaporador rotativo.

3.5 Avaliação das propriedades dos extratos

3.5.1 Conteúdo fenólico total

O conteúdo fenólico total foi determinado a partir do método do reagente de Folin-Ciocalteu adaptado de (A. M. T. Silva *et al.*, 2007). As amostras e o branco foram preparados em cuvetes, com a composição indicada na Tabela B.1.1, no Apêndice B. Após a adição da amostra, água e reagente de Folin-Ciocalteu, as cuvetes foram deixadas a repousar durante cerca de 5 min e depois foi adicionada a solução de carbonato de sódio. Depois do repouso durante mais duas horas, procedeu-se à leitura da absorvância a $\lambda=750\text{nm}$. Para ser possível obter os resultados em equivalentes de ácido gálico (GAE), foi igualmente preparada uma reta de calibração com ácido gálico a várias concentrações.

3.5.2 Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos foi determinada pelo método do 2,2-difenil-2-picrilhidrazil, mais conhecido por DPPH, adaptando o protocolo indicado por (Bobo-García *et al.*, 2015). No entanto, neste estudo, devido à elevada quantidade de amostras, utilizaram-se microplacas. Assim, as quantidades de amostra, DPPH, carbonato de sódio e água foram adaptadas para perfazer um volume de 200 μL . O esquema da microplaca encontra-se na Figura B.2.2 do Apêndice B. Após a adição do DPPH, a placa foi deixada a repousar no escuro durante 40 min e a absorvância medida a $\lambda=515\text{ nm}$.

3.5.3 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos de casca de melão (ECM) e dos extratos de casca de abóbora (ECA) foi determinada a partir do teste de suscetibilidade por difusão em disco, de Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1966). As bactérias selecionadas foram a *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli*. As suspensões foram feitas a partir de uma cultura pura, em solução com NaCl a 0,9 %, em que a densidade ótica foi ajustada a um valor entre 0,09 e 0,1. Com recurso a uma zaragatoa, as estirpes foram inoculadas sobre as placas com meio de cultura *Plate Count Agar*

(PCA). Pequenos discos de papel, com cerca de 9 mm, foram colocados sobre a placa e foram posteriormente impregnados com cerca de 7 μL de cada extrato com concentrações de 500 mgmL^{-1} e 1000 mgmL^{-1} . Para cada concentração de extrato foram realizadas 3 réplicas. Como controlo positivo foi utilizado o ácido sórbico (500 mgmL^{-1} e 1000 mgmL^{-1}) e como controlo negativo a água ultrapura. As placas foram incubadas, durante 24 horas, a 37 ° C, tempo após o qual foram avaliados os halos de inibição da atividade dos microrganismos.

3.6 Produção do iogurte e incorporação dos extratos

O iogurte foi produzido tendo por base outro iogurte natural, probiótico e sólido, por método semelhante ao indicado por (Caleja *et al.*, 2016): cerca de 500 mL de leite UHT meio gordo foi aquecido até uma temperatura de 80 ° C, tendo-se mantido esta temperatura constante durante 15 minutos. O leite foi posteriormente retirado do banho e arrefecido até 40 ° C, tempo após o qual se adicionou 125 g do referido iogurte e, mantendo a temperatura constante, a mistura foi constantemente agitada.

Após os 10 minutos, 25 g da mistura foram distribuídos por 8 frascos adicionados o ácido sórbico e os extratos de acordo com as quantidades indicadas na Tabela 3.6.1. Estes valores encontram-se relacionados com o limite legal de ácido sórbico para produtos à base de leite fermentado (conforme anteriormente referido, 1000 mgL^{-1} nos termos do Regulamento (UE) N°1129/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 11 de Novembro de 2011 relativo a aditivos alimentares) que neste iogurte se traduz numa quantidade de 20 mg de ácido sórbico para 25 g de mistura de leite/iogurte.

Tabela 3.6.1 Composição dos iogurtes produzidos.

Iogurte	Ácido sórbico (mg)	ECM (mg)	ECA (mg)
CN	-	-	-
CP	20	-	-
M1	-	20	-
M2	-	40	-
AB1	-	-	20
AB2	-	-	40
MIXA	-	20	20
MIXAP	20	20	20

Nota: CN – controlo negativo, CP – controlo positivo, M1 – Iogurte de melão 1, M2 – iogurte de melão 2; AB1 – iogurte de abóbora 1; AB2 – iogurte de abóbora; MIXA – iogurte com extratos de melão e abóbora; MIXAP -iogurte com extrato de melão e abóbora e ácido sórbico, ECM – extrato de casca de melão, ECA – extrato de casca de abóbora.

Posteriormente, procedeu-se à incubação do iogurte, durante 11 horas, numa estufa a 40 ° C. Após este tempo, os iogurtes foram transferidos para o frigorífico, mantendo-se a 2 ° C.

3.7 Testes de estabilidade

3.7.1 Teste de pH

O valor de pH dos iogurtes foi determinado com recurso a um medidor de pH digital, tendo as amostras sido diluídas a uma proporção de 1:9 (m/V). Os testes de pH foram realizados ao final de 1 e 14 dias após o armazenamento dos iogurtes (Umeyra Bakirci *et al.*, 2016).

3.7.2 Sinérese

A análise da sinérese do iogurte foi realizada de acordo com (Cho *et al.*, 2020), com ligeiras modificações. Amostras de 2 g de iogurte foram centrifugadas a 700 g, durante 20 min, a aproximadamente 4 ° C. O sobrenadante foi posteriormente recolhido e pesado. Os testes foram realizados ao final de 1 e 14 dias após o armazenamento dos iogurtes.

3.7.3 Capacidade antimicrobiana

Para os ensaios antibacterianos, foi desenvolvido o método de difusão em poços de ágar, para a determinação da atividade antimicrobiana, com o meio de cultura PCA, semelhante ao método realizado por (Neglo *et al.*, 2021). Para tal, foram selecionadas as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, cujas suspensões foram realizadas como indicado no Subcapítulo 3.5. Após a inoculação das estirpes sobre as placas, foram delimitados 4 quadrantes e abertos 4 poços no ágar, com uma pipeta de Pasteur esterilizada. Foi adicionado cerca de 0,5 mL de iogurte a cada um dos poços, tendo sido feitas 3 réplicas para cada iogurte. As placas foram incubadas a 37 ° C, numa estufa, durante 24 horas, após o qual foram avaliados os halos de inibição de atividade dos microrganismos.

Adicionalmente, para verificação de uma possível contaminação dos iogurtes, foram realizados ensaios de espalhamento do iogurte nas placas, com meio de cultura ágar rosa bengala com cloranfenicol (RBC), para a verificação da presença de leveduras e bolores, e com o meio de cultura caldo lauril sulfato (LSA), e para a verificação de *Escherichia coli*. Este método foi adaptado de (Jerry O. *et al.*, 2016). Cada amostra de iogurte foi diluída em série misturando, num tubo de ensaio, primeiramente, 1 mL de iogurte em 9 mL de solução de 0,9 % de NaCl. Seguidamente, 1 mL da mistura do primeiro tubo de ensaio foi colocada num segundo que já continha 9 mL da solução salina, sendo obtida a segunda diluição. Este processo foi repetido o

número de vezes necessário até se obter as diluições pretendidas. Finalmente, cerca de 1 mL das soluções obtidas nos diferentes tubos de ensaio foram colocadas no centro das placas e posteriormente espalhadas. Foram também criadas placas com iogurte sem diluição. Todas as placas foram incubadas a 37 °C , numa estufa, durante 24 horas, após o qual foi verificado se ocorreu o crescimento de microrganismos.

3.7.4 Conteúdo fenólico total

O conteúdo fenólico total dos iogurtes foi determinado de acordo com o processo indicado para os extratos, no Subcapítulo 3.5. Para além da preparação do branco e das amostras em cuvetes, foi preparado o branco da amostra, que consistia em apenas 20 µL de iogurte com 1980 µL de água ultrapura. O teste do conteúdo fenólico foi realizado 1 e 14 dias após o armazenamento dos iogurtes (Taneva & Zlatev, 2020).

3.7.5 Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante dos iogurtes foi determinado de acordo com o processo indicado para os extratos, no Subcapítulo 3.5. O teste do conteúdo fenólico foi realizado 1 e 14 dias após o armazenamento dos iogurtes (Taneva & Zlatev, 2020).

3.7.6 Viscosidade aparente

A viscosidade das amostras em função da taxa de deformação, entre 1 s⁻¹ e 100 s⁻¹, foi determinada com recurso a um reómetro, a 25 °C (Najgebauer-Lejko *et al.*, 2020). Este parâmetro foi determinado 1 e 14 dias após a produção dos iogurtes. Adicionalmente, no dia 1, foi desenvolvido um ensaio da viscosidade aparente em função da temperatura, com uma subida de temperatura de 2 °C a 25 °C, e a descida, a uma taxa de deformação de 80 s⁻¹.

3.8 Acondicionamento, tratamento e destino dos resíduos

Os resíduos líquidos gerados, que consistiam, na sua maioria, em soluções orgânicas com etanol e metanol, foram recolhidos em recipientes fechados, devidamente identificados, e armazenados longe da luz e de possíveis fontes de ignição para depois serem encaminhados para o EcoFEUP (Sistema de Gestão Ambiental da FEUP) com vista ao seu tratamento.

4 Resultados e Discussão

4.1 Obtenção dos extratos

As cascas de melão e de abóbora foram tratadas através de dois processos de secagem diferentes. As cascas de melão foram secas com recurso à congelação seguida da liofilização, um processo eficaz, mas dispendioso, principalmente porque demora bastante tempo o que lhe confere elevados custos energéticos. As cascas de abóbora foram introduzidas em recipientes abertos de vidro e posteriormente secas num forno de vidro, durante cerca de 15 horas, envolvendo custos energéticos inferiores mesmo que, terminado este processo, tenha sido necessário colocar as cascas durante a noite na estufa, a 60 °C, para completar a sua secagem (já que se verificou que a amostra ainda aparentava estar húmida devido à presença de gotas de água nas paredes dos recipientes de vidro).

Tendo-se alcançado, em ambos os casos, a secagem completa das cascas, o processo mais viável de ser utilizado a nível industrial parece ser aquele que recorre apenas à estufa ou ao forno de vidro em conjunto com a estufa, por ser mais económico. Aliás, (Morais *et al.*, 2015) verificaram que, para a casca de melão, apesar de o conteúdo fenólico extraído ser superior para cascas liofilizadas do que para cascas secas no forno, a capacidade antioxidante era superior para as cascas secas no forno.

Os extratos das cascas de melão e abóbora foram obtidos por dois processos ligeiramente diferentes, ambos recorrendo ao método de extração por Soxhlet. As cascas de melão foram sujeitas a uma primeira extração com ultrassons, que provoca o rompimento das células, tendo em vista aumentar o rendimento da extração por Soxhlet. As cascas de abóbora foram sujeitas apenas a Soxhlet. Este método de extração foi selecionado por ser adequado à extração dos CBAs de interesse, ter baixos custos de operação e ser de simples manipulação (Patra *et al.*, 2022).

Relativamente ao solvente de extração, é importante mencionar que, como se pretende incorporar os extratos em alimentos, o solvente tem de ser reconhecido como *Generally Recognized As Safe* (GRAS). Assim, optou-se pela utilização do etanol, um solvente ligeiramente menos polar que o metanol. Apesar de, na literatura, o metanol ser o solvente mais utilizado, para (Saavedra *et al.*, 2015), o rendimento de extração foi superior quando utilizado etanol (70 %) em vez do metanol (70 %).

(Gómez-García *et al.*, 2021; Mallek-Ayadi *et al.*, 2017) procederam a extrações de compostos da casca de melão com o solvente de extração metanol (80 %) e etanol (95 %), respetivamente, tendo sido identificados compostos fenólicos, carotenóides e flavonóides nos extratos obtidos. Contudo, ainda que os compostos extraídos sejam coincidentes com os de interesse no presente estudo, optou-se por aumentar a razão amostra-solvente de extração (quer para a casaca de melão quer para a casca de abóbora) para 1:20, e não utilizar a razão de 1:10 utilizada nos artigos anteriores, uma vez que quanto maior este parâmetro maior o rendimento de extração (Fontana *et al.*, 2013).

O rendimento obtido para as cascas de melão, de abóbora e respetivas condições de extração encontram-se na Tabela 4.1.1, assim como alguns resultados presentes na literatura. Os valores de rendimento indicados na tabela são os médios das extrações realizadas. No Apêndice A, Tabela A.2.2 e A.2.3 são apresentados todos os valores obtidos.

Tabela 4.1.1 Condições de preparação de extratos de diversas cascas, e respetivos rendimentos, obtidos no presente estudo e referidos na literatura.

Estudos	Amostra	Solvente de extração	Condições	Rendimento (%)
Nosso estudo	Casca de melão	etanol	01:20 Soxhlet	24,82
	Casca de abóbora		80 ° C 2 horas	44,81
(Tostes <i>et al.</i> , 2016)	Casca de maçã	etanol	1:50 Soxhlet - 2 horas	58,71
(Massa <i>et al.</i> , 2019)	Casca e sementes de abóbora	etanol	- Soxhlet 78 ° C 8 horas	35,80
(Neglo <i>et al.</i> , 2021)	Casca de melancia	metanol	1:6 Agitação 21 ° C 24 horas	16,30
(Hrnčič <i>et al.</i> , 2019)	Casca de uva	etanol	1:9 Soxhlet - 4 horas	73,00

De acordo com alguns referenciais constantes da literatura, é possível verificar que os rendimentos de extração de cascas, com solvente de extração etanol, e com recurso ao Soxhlet encontram-se dentro de um intervalo de 35 % a 73 %.

É de salientar que os rendimentos de extração das cascas estão fortemente relacionados com as condições de extração, concentração de compostos que podem ser extraídos e das condições iniciais da amostra. Adicionalmente, deverá referir-se que a comparação poderá ser penalizada pelo facto de não existirem na literatura referenciais que resultem da aplicação, quer para as cascas de melão, quer para as cascas de abóbora, de método igual ao aplicado neste estudo. Por exemplo, a extração-sólido líquido com ultrassons inicial, pode permitir o aumento do rendimento de extração por Soxhlet dos compostos da casca de melão.

Ainda assim, salienta-se que os rendimentos de extração para as cascas de melão e abóbora encontram-se próximos ou dentro intervalo dos referenciais encontrados na literatura.

4.2 Avaliação dos extratos

4.2.1 Determinação do conteúdo fenólico pelo método do reagente de Folin-Ciocalteu

O conteúdo fenólico de cada extrato foi obtido através do método do reagente de Folin-Ciocalteu. Os resultados obtidos para o ECM e para o ECA encontram-se na Tabela 4.2.1.1.

Tabela 4.2.1.1 Conteúdo fenólico dos extratos de casca de melão e abóbora ($\text{mg}_{\text{GAE}}\text{g}^{-1}_{\text{extrato}}$) obtidos no presente estudo e mencionados na literatura.

Estudos	Amostra	Conteúdo fenólico	
		$\text{mg}_{\text{GAE}}\text{g}^{-1}_{\text{extrato}}$	$\text{mg}_{\text{GAE}}(100\text{g}_{\text{dm}})^{-1}$
Nosso estudo	ECM	53,41	746,52
	ECA	18,21	83,96
(Mallek-Ayadi <i>et al.</i> , 2017)	ECM	3,32	-
(Morais <i>et al.</i> , 2015)	ECM	-	227,07
(Salami <i>et al.</i> , 2021)	ECA	3,53	-
(Ali & Naz, 2017)	ECA	2,68	-

Nota: GAE – equivalentes de ácido gálico, dm – matéria seca, ECM – Extrato de casca de melão, ECA – Extrato de casca de abóbora.

Os resultados obtidos para ambas as cascas revelaram ser superiores aos da literatura.

Fatores como a espécie e maturidade da fruta, o ambiente em que esta se desenvolveu e as condições de armazenamento após a colheita são reconhecidos como podendo influenciar o conteúdo fenólico nas frutas (Shofian *et al.*, 2011). Adicionalmente, diferenças no método, solvente e tempo de extração também influenciam este parâmetro. Isto pode ser confirmado por (Asghar *et al.*, 2012) que determinaram que o conteúdo fenólico nos extratos de cascas de melão era superior, de entre 4 solventes de extração, para o metanol(polar) e o n-hexano(apolar), pois apesar da maior parte dos compostos fenólicos ser polar, existem alguns apolares. O etanol, sendo constituído por um grupo polar e apolar é capaz de dissolver ambos os tipos de compostos fenólicos.

É, contudo, possível concluir que, para ambos os extratos, os valores experimentais de conteúdo fenólico obtidos foram, em geral, mais altos que os valores da literatura, pelo que o processo de extração para ambos o extrato obteve bons rendimentos.

É interessante mencionar que o rendimento de extração inferior das cascas de melão (quando comparado com o rendimento de extração das cascas de abóbora), não se traduziu num menor conteúdo de compostos fenólicos. Uma explicação possível é que da casca de abóbora terão sido extraídos outros compostos solúveis em etanol, como os carotenóides, nos quais a casca de abóbora é rica.

4.2.2 Determinação da capacidade antioxidante pelo DPPH

A capacidade antioxidante dos extratos foi determinada com base no ensaio do DPPH, e esta encontra-se representada pela capacidade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) e pela concentração inibitória média (IC₅₀), na Tabela 4.2.2.1.

Tabela 4.2.2.1 Resultados obtidos para a capacidade antioxidante dos extratos no presente estudo, em percentagem de inibição do DPPH (%), TEAC ($\mu\text{mol}_{\text{Trolox}}\text{g}^{-1}\text{extrato}$) e IC₅₀ ($\text{mg}_{\text{extrato}}\text{L}^{-1}$) e na literatura.

Estudos	Amostra	Capacidade antioxidante		
		Inibição do DPPH (%)	TEAC ($\mu\text{mol}_{\text{Trolox}}\text{g}^{-1}\text{extrato}$)	IC ₅₀ ($\text{mg}_{\text{extrato}}\text{L}^{-1}$)
Nosso estudo	ECM	62,85	153,9	192,4
	ECA	7,398	41,91	698,0
(Ahmad Wakid & Azrin binti Harun, 2020)	ECM	-	-	461,0
(Morais <i>et al.</i> , 2015)	ECM	-	-	225,3

Estudos	Amostra	Capacidade antioxidante		
		Inibição do DPPH (%)	TEAC ($\mu\text{mol}_{\text{Trolox}} \text{g}^{-1} \text{extrato}$)	IC ₅₀ ($\text{mg}_{\text{extrato}} \text{L}^{-1}$)
(Salami <i>et al.</i> , 2021)	ECA	2,158	-	-
(Ali & Naz, 2017)	ECA	-	-	3204

Nota: TEAC – Capacidade antioxidante equivalente de Trolox; IC₅₀ – Concentração inibitória média, E – extrato; ECM – Extrato de casca de melão, ECA – Extrato de casca de abóbora.

O conteúdo em compostos fenólicos está relacionado com a capacidade antioxidante do extrato, pelo que era esperado que o ECM apresentasse uma capacidade antioxidante superior. Um TEAC superior significa uma maior capacidade antioxidante. A concentração inibitória média do ECM obtido foi inferior ao do ECA, o que se encontra concordante com os resultados. Do mesmo modo, para uma concentração de $250 \text{ mg}_{\text{extrato}} \text{L}^{-1}$, o ECM apresenta uma inibição do DPPH consideravelmente superior.

Verificou-se também que a capacidade antioxidante de ambos os extratos foi superior aos referenciais encontrados na literatura. Tal como referido anteriormente, a capacidade antioxidantes dos extratos é influenciada por fatores como a espécie e maturidade da fruta, o ambiente em que esta se desenvolveu e as condições de armazenamento após a colheita assim como diferenças no método, solvente e tempo de extração. Adicionalmente valores muito distintos de capacidade antioxidante podem ser devidos, por um lado, a diferentes protocolos de ensaio com DPPH, e por outro, a gamas de concentrações diferentes. A gama de concentrações, neste estudo, foi acima daquela em média utilizada na literatura. Para concentrações abaixo das utilizadas, verificou-se que a absorvância obtida era devido à cor do DPPH, pelo que foi necessário aumentar a gama de concentrações utilizada.

Em todo o caso, os resultados obtidos parecem revelar que os extratos apresentam uma boa capacidade antioxidante.

4.2.3 Ensaio antimicrobianos

Nos ensaios antimicrobianos, as bactérias de referência selecionadas foram as *Staphylococcus aureus*, bactérias Gram-positivas, e as *Escherichia coli*, bactérias Gram-negativas. Estas bactérias foram selecionadas com base no seu impacto na saúde humana, particularmente porque estas bactérias são regularmente associadas à propagação de doenças transmitidas por alimentos. Como controlo positivo foi utilizado o ácido sórbico, o conservante de origem sintética em estudo (York & Vaughn, 1964). Os resultados dos ensaios antimicrobianos encontram-se

representados na Tabela 4.2.3.1. Cada amostra foi realizada em triplicado, sendo o valor apresentado a média dos ensaios. Na Tabela B.3.1, do Apêndice B, encontram-se os resultados obtidos.

Tabela 4.2.3.1 Resultados médios obtidos para os halos de inibição dos extratos e controles (cm), a concentrações 500 mgmL⁻¹ e 1000 mgmL⁻¹ e controles, após 24h de incubação.

Bactéria	d _{halo} (cm)						água ultrapura
	Extrato				Controlos		
	ECM		ECA		ácido sórbico		
	500 (mgmL ⁻¹)	1000 (mgmL ⁻¹)	500 (mgmL ⁻¹)	1000 (mgmL ⁻¹)	500 (mgmL ⁻¹)	1000 (mgmL ⁻¹)	
<i>S.aureus</i>	<0,9	<0,9	<0,9	1,0	<0,9	1,2	<0,9
<i>E.coli</i>	<0,9	<0,9	<0,9	<0,9	<0,9	1,4	<0,9

Nota: ECM – Extrato de casca de melão, ECA – Extrato de casca de abóbora.

A notação <0,9 é referente aos ensaios em que não foi possível medir o halo de inibição.

Através da análise da Tabela 8, por um lado, verifica-se que a água não apresentou halos de inibição para nenhuma das bactérias. Tal era espectável, visto que a água é o controlo negativo, pelo que não inibe nenhuma das estirpes estudadas. Por outro lado, o ácido sórbico apresentou halos de inibição para ambas as estirpes, o que era esperado, visto que este é um controlo positivo de referência para as bactérias estudadas.

A ausência de halos por parte do ECM, para ambas as estirpes indicam que este extrato não inibe estas bactérias. No entanto, verifica-se uma ausência de estudos na literatura sobre os efeitos antimicrobianos do ECM e ECA.

A título de exemplo, (Neglo *et al.*, 2021) avaliaram os halos de inibição para ambas as estirpes estudadas para o extrato de casca de melancia, e concluíram que esta possuía atividade inibitória para ambas as estirpes, numa concentração de a 500 mgmL⁻¹.

Contudo, é de salientar que a não verificação dos halos não significa necessariamente que não ocorreu inibição. O diâmetro do halo pode ser inferior ao diâmetro do disco, pelo que não é visível, ou a concentração de extrato utilizada pode não conter CBAs suficientes para desencadear um efeito antibacteriano. Adicionalmente, neste estudo foi utilizado o método de difusão em disco, enquanto na referida literatura foi utilizado o método de difusão em poços, o que também pode influenciar os resultados.

Quanto ao ECA, verificou-se que se desenvolveu apenas um halo de inibição na concentração de 1000 mgmL⁻¹ para as bactérias de *S.aureus*, sendo que (Zawane Kamarudin *et al.*, 2014) concluíram que o ECA apresentava halos de inibição para ambas as estirpes. A

justificação para esta discrepância de resultados pode, por um lado, estar na diferença de quantidade de extrato colocada nos discos e, por outro lado, no facto de os discos utilizados no procedimento da referência serem menores que os utilizados no presente estudo, pelo que, nos resultados experimentais, os halos podem ainda não ser visíveis. De facto, era espectável que a ação antibacteriana fosse superior para a *S.aureus*, por esta ser gram-positiva, apresentando uma membrana exterior de peptidoglicanos que, ao contrário da camada exterior fosfolipídica das bactérias gram-negativas, torna a bactéria mais permeável a substâncias antibacterianas (Zawane Kamarudin *et al.*, 2014). É importante ainda mencionar que os solventes de extração utilizados foram diferentes, o que pode alterar a composição dos extratos e consequentemente a sua capacidade antimicrobiana (Zawane Kamarudin *et al.*, 2014).

Refira-se, finalmente, que ainda que o ECA tenha apresentado menos compostos fenólicos, revelou rendimento superior, levantando a hipótese de os compostos não fenólicos extraídos poderem ter uma atividade antimicrobiana relevante.

4.3 Produção do iogurte

O iogurte produzido revelou ter uma densidade aproximada de 1250 gL^{-1} , tendo sido calculada diretamente a partir da massa e do volume conforme admitido por (Mumba & Tsige, 2007). Este valor é consideravelmente superior à densidade do leite, de 1030 gL^{-1} (Rafaela Da Silva *et al.*, 2017). De facto, a subida da densidade é um indicador do fenómeno da fermentação por parte das bactérias. O aumento da concentração de ácido láctico, fruto da fermentação látea, provoca a aglomeração das caseínas, que irão alterar a consistência do leite, tornando-o mais espesso e denso. Na Figura 4.3.1 encontram-se os oito iogurtes produzidos, e respetiva composição.

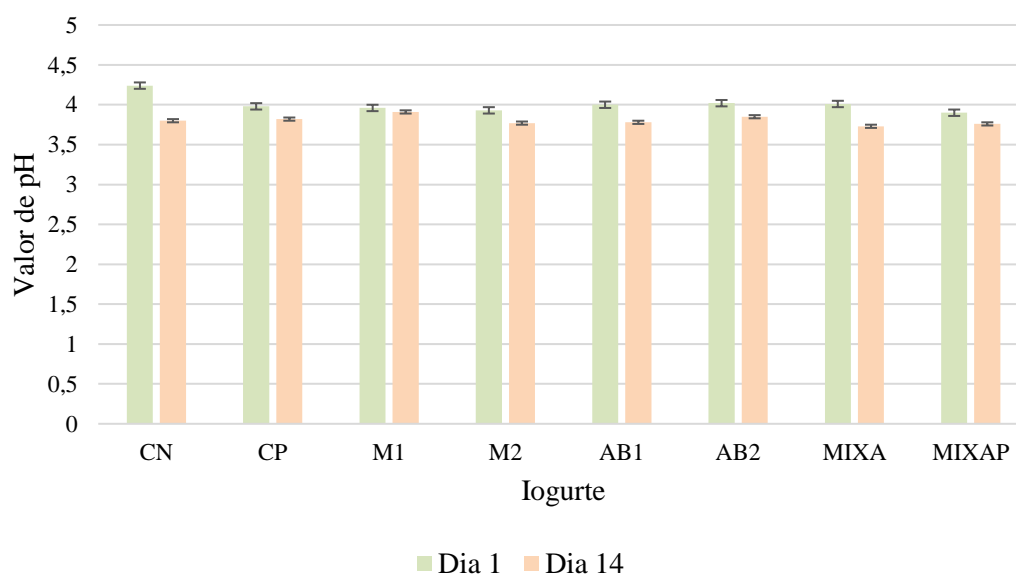


Controlo negativo CN	Controlo positivo CP	Melão 1 M1	Melão 2 M2	Abóbora 1 AB1	Abóbora 2 AB2	Mix amostras MIXA	Mix amostras + padrão MIX AP
Sem aditivos	0,08 % ácido sórbico	0,08 % ECM	0,16 % ECM	0,08 % ECA	0,16 % ECA	0,08 % ECM + 0,08 % ECA	0,08 % ácido sórbico + 0,08 % ECM + 0,08 % ECA

Figura 4.3.1 Fotografia dos iogurtes desenvolvidos e respetiva composição.

4.4 Testes de estabilidade

A estabilidade dos iogurtes foi avaliada, nos dias 1 e 14 após a sua produção. Na Figura 4.4.1. apresentam-se os resultados para o pH dos iogurtes.



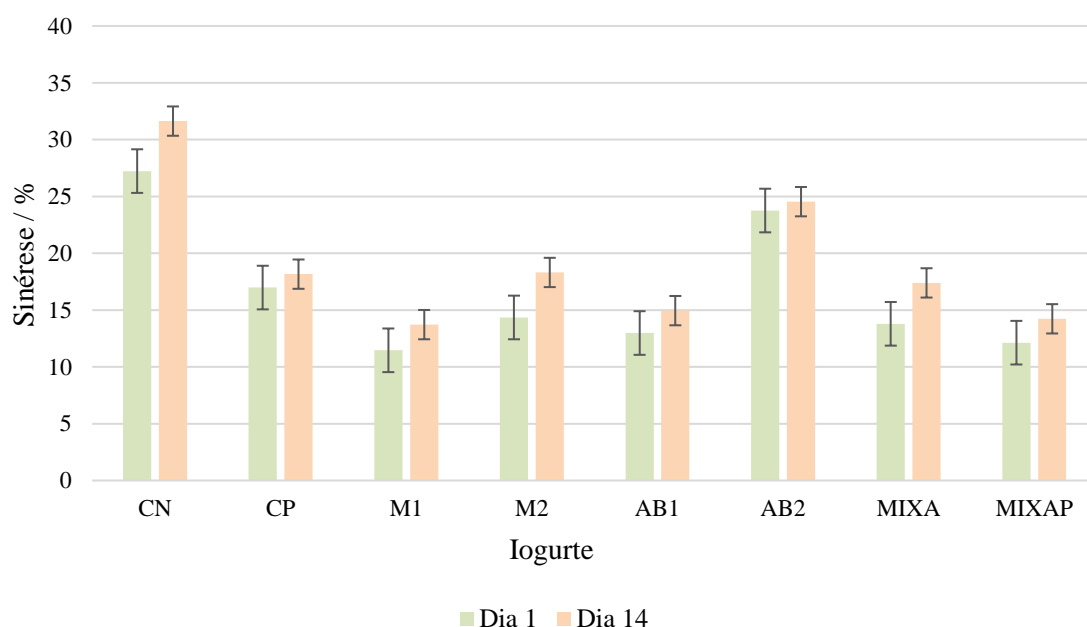
Nota: CN – controlo negativo, CP – controlo positivo, M1 – Iogurte de melão 1, M2 – iogurte de melão 2; AB1 – iogurte de abóbora 1; AB2 – iogurte de abóbora; MIXA – iogurte com extratos de melão e abóbora; MIXAP -iogurte com extrato de melão e abóbora e ácido sórbico.

Figura 4.4.1 Resultados obtidos para o valor de pH dos diferentes iogurtes, nos dias 1 e 14.

Relativamente ao pH, verifica-se que todos os iogurtes apresentam um valor abaixo de 4,6 que, segundo a *Internacional Dairy Foods Association (IDFA)* é o valor máximo que este parâmetro pode exibir para iogurtes. Este é o ponto isoelétrico das caseínas, pelo que abaixo deste valor a atração entre proteínas aumenta permitindo que estas se agreguem, dando origem à textura característica do iogurte (Lee & Lucey, 2010). No 1º dia dos ensaios, a adição do ácido sórbico e dos extratos resultou na diminuição do pH do iogurte, face ao controlo negativo, como seria de esperar devido à presença dos compostos acídicos nestas substâncias. O valor do pH tem naturalmente de ser controlado, sendo que sabor acídico do iogurte tem influência na opinião dos consumidores.

Com o contingente de não haver contaminações, a diminuição do pH é reveladora da produção de mais ácido láctico pelas bactérias do leite, o que ocorre quando a temperatura do iogurte sobe, como por exemplo, quando é retirado do frigorífico. O pH reduziu-se ligeiramente ao longo dos 14 dias, o que era expectável. A adição dos extratos não pareceu interferir com o desenvolvimento das bactérias do ácido láctico.

A variação do pH é um fator que afeta propriedades físicas do iogurte, como a sinérese, cuja variação se encontra representada na Figura 4.4.2.



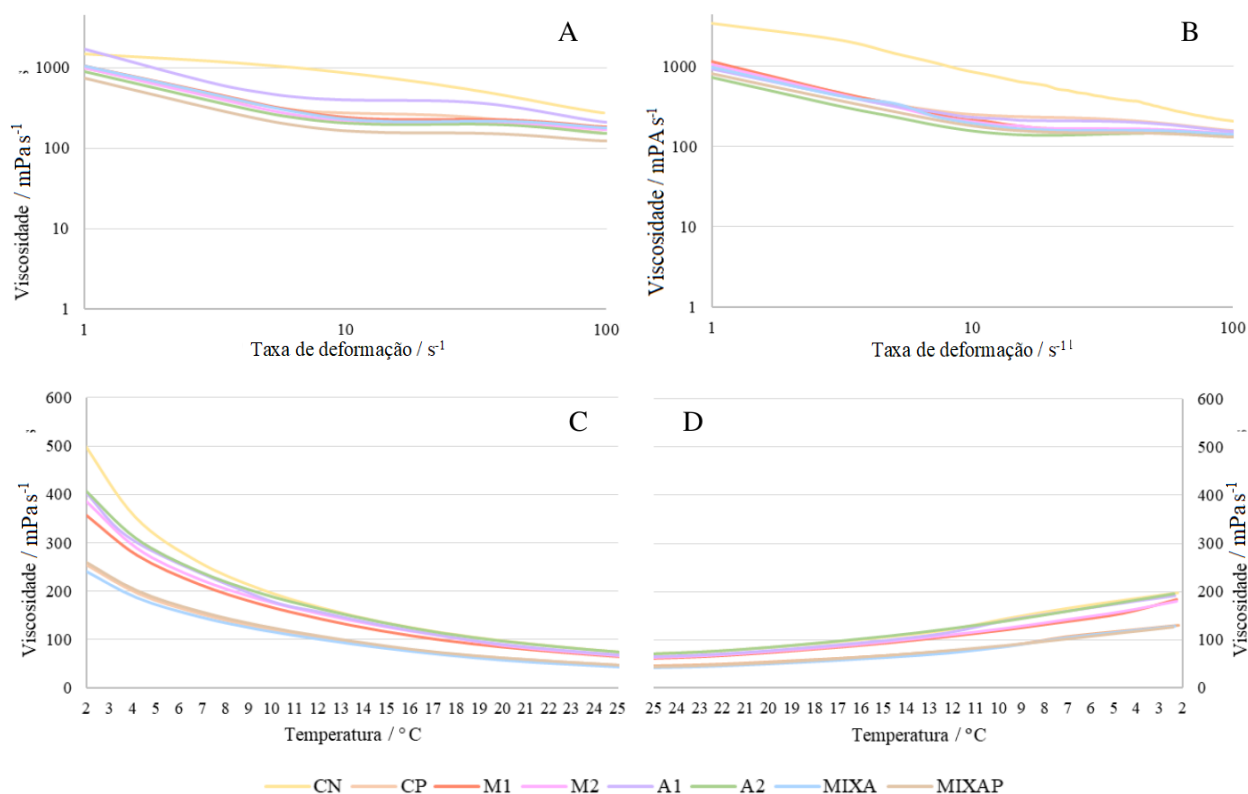
Nota: CN – controlo negativo, CP – controlo positivo, M1 – Iogurte de melão 1, M2 – iogurte de melão 2; AB1 – iogurte de abóbora 1; AB2 – iogurte de abóbora; MIXA – iogurte com extratos de melão e abóbora; MIXAP -iogurte com extrato de melão e abóbora e ácido sórbico.

Figura 4.4.2 Resultados obtidos para a sinérese (%) dos diferentes iogurtes, nos dias 1 e 14.

A sinérese é a formação de uma camada de soro sobre o iogurte. Apesar de ser um fenómeno natural, a sinérese pode criar uma reação indesejada pelos consumidores. A sinérese é inversamente proporcional ao pH. Isto porque, mesmo com uma ligeira diminuição do pH, ocorre a redução da carga elétrica das micelas, o que diminui a estabilidade coloidal, resultando na libertação de soro por parte da matriz de gel (Walstra *et al.*, 2005). Assim, como se verificou que o pH diminuiu do dia 1 para o dia 14, a sinérese aumentou dentro do mesmo tempo, pelo que os dados observados são concordantes.

Outro fator de grande importância para o consumidor é a viscosidade do produto, que se encontra representada na Figura 4.4.3. É possível verificar que, apesar dos iogurtes apresentarem diferentes viscosidades iniciais, o aumento da taxa de deformação leva a uma aproximação dos valores de viscosidade, quer no início quer no fim do estudo. A variação da viscosidade em função da taxa de deformação para os mesmos iogurtes, que se encontra na Figura C.1.2 do Apêndice C, é semelhante nos dias 1 e 14. Adicionalmente, ao fim dos 14 dias, todos os iogurtes em que foram adicionados extratos ou conservantes apresentam viscosidades similares.

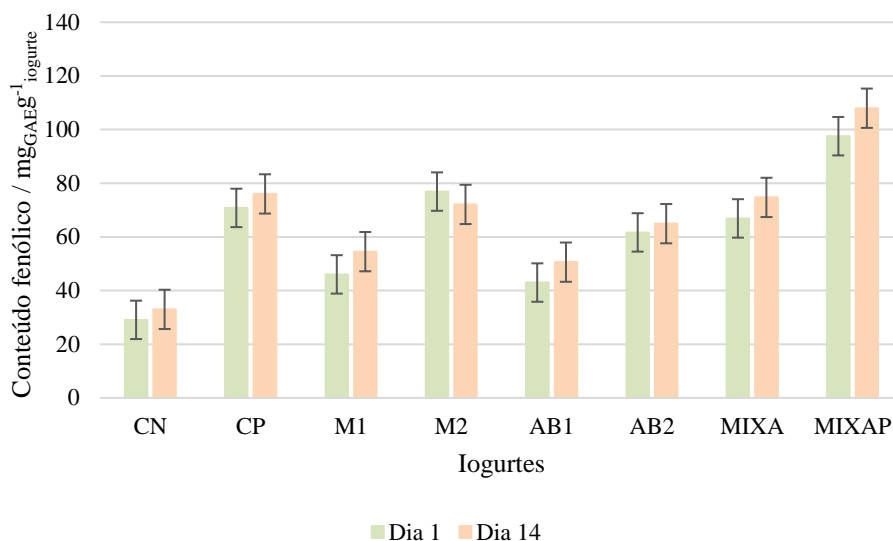
Os extratos de ECM e ECA contêm, para além de fibras dietéticas, pectina que é utilizada como um espessante pela indústria, pelo que a viscosidade dos iogurtes com extratos é um pouco superior ao do controlo positivo (Umeyra Bakirci *et al.*, 2016) (Cho *et al.*, 2020). O controlo negativo destaca-se pela sua alta viscosidade, quando comparado com os restantes iogurtes, o que não era expectável. No entanto, durante a produção deste iogurte, não foi necessário misturá-lo para incorporar nenhum composto, pelo que esta pode ser uma razão para esta discrepância. O aumento da temperatura leva a uma clara diminuição da viscosidade dos iogurtes, sendo este processo irreversível, pois quando a temperatura do iogurte baixa novamente para o mesmo valor, a viscosidade não volta ao nível inicial. A partir dos resultados indicados na Tabela C.1.2 do Apêndice C, é possível afirmar que todos os iogurtes apresentaram um comportamento de fluido pseudoplástico.



Nota: CN – controlo negativo, CP – controlo positivo, M1 – Iogurte de melão 1, M2 – iogurte de melão 2; AB1 – iogurte de abóbora 1; AB2 – iogurte de abóbora; MIXA – iogurte com extratos de melão e abóbora; MIXAP – iogurte com extrato de melão e abóbora e ácido sórbico.

Figura 4.4.3 Resultados obtidos para a viscosidade aparente ($\text{mPa}\cdot\text{s}^{-1}$) dos iogurtes, em função da taxa de deformação (s^{-1}) nos dias 1 (A) e 14 (B), e variação de viscosidade aparente com temperatura crescente (C) e temperatura decrescente (D), no dia 1.

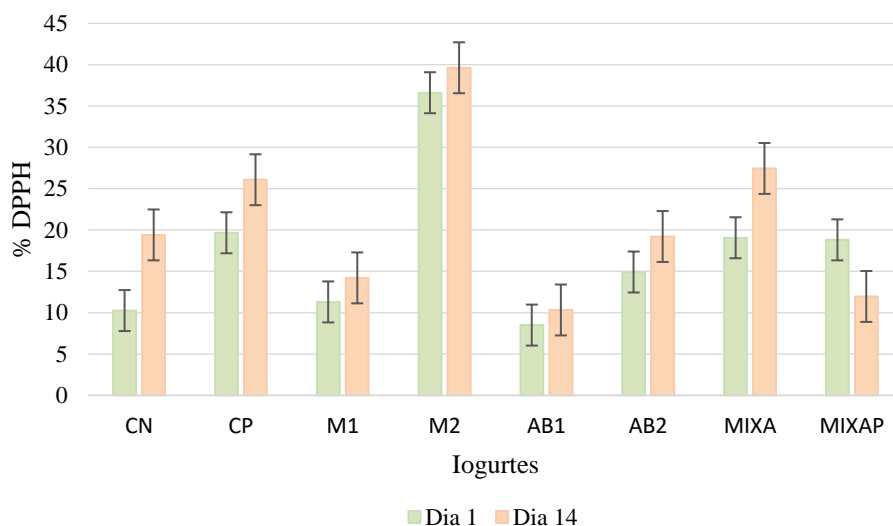
Relativamente ao conteúdo fenólico, cujos resultados se encontram na Figura 4.4.4, é possível verificar que todos os iogurtes apresentam compostos fenólicos. Para os iogurtes em que foi incorporado os ECM e ECA, os valores de conteúdo fenólico observados resultam da possível existência de compostos fenólicos nestes extratos, o que já era esperado. Para o controlo negativo e o controlo positivo, o conteúdo fenólico determinado pode dever-se a açúcares, proteínas e aminoácidos naturalmente presentes no iogurte e que interferiram com a medida do TPC (Amirdivani & Baba, 2011). O aumento do conteúdo fenólico em quase todos os iogurtes durante o período de estudo pode dever-se à degradação da lactase pelas bactérias, que poderá conduzir à libertação de alguns compostos fenólicos (Alenisan *et al.*, 2017).



Nota: CN – controlo negativo, CP – controlo positivo, M1 – Iogurte de melão 1, M2 – iogurte de melão 2; AB1 – iogurte de abóbora 1; AB2 – iogurte de abóbora; MIXA – iogurte com extratos de melão e abóbora; MIXAP – iogurte com extrato de melão e abóbora e ácido sórbico.

Figura 4.4.4 Conteúdo fenólico total dos iogurtes ($\text{mg}_{\text{GAE}} \text{g}^{-1}_{\text{iogurte}}$), para os iogurtes, nos dias 1 e 14.

O conteúdo fenólico influencia a capacidade antioxidante conforme se representa na Figura 4.4.5.



Nota: CN – controlo negativo, CP – controlo positivo, M1 – Iogurte de melão 1, M2 – iogurte de melão 2; AB1 – iogurte de abóbora 1; AB2 – iogurte de abóbora; MIXA – iogurte com extratos de melão e abóbora; MIXAP – iogurte com extrato de melão e abóbora e ácido sórbico.

Figura 4.4.5 Percentagem de inibição do DPPH, para 500 mg mL^{-1} de iogurte, nos dias 1 e 14.

É possível verificar que a adição dos extratos contribuiu para o aumento da capacidade antioxidante dos iogurtes incorporados, sendo que a capacidade antioxidante do iogurte de melão 2 é inclusive superior àquela do controlo positivo. O aumento da capacidade antioxidante ao longo

dos 14 dias também era expectável pois a produção de ácido láctico, aliado com a proteólise das proteínas, resultante da atividade metabólica das bactérias, pode formar outros compostos antioxidantes detetados pelo DPPH (Dziuba & Dziuba, 2014). No entanto, apesar do conteúdo fenólico ser superior no iogurte MIXAP, verifica-se que isso não se traduziu numa maior capacidade antioxidante. Apesar de não haver resultados na literatura que justifiquem esta diminuição, pode ter ocorrido um efeito antagónico entre os extratos e o ácido sórbico, que conduziram aos valores observados. Assim, este seria um ensaio importante a repetir no futuro, para averiguar esta diminuição.

Relativamente aos ensaios antimicrobianos, os resultados dos halos de inibição encontram-se na Tabela 4.4.1. É de salientar que os valores representados são os referenciais médios das três réplicas executadas, sendo que os resultados se encontram no Apêndice C, na Tabela C.1.3.

Tabela 4.4.1 Resultados para os halos de inibição obtidos (cm), para os iogurtes, nos dias 1 e 14.

Bactéria	Dia	d_{halo} (cm)							
		Iogurtes							
		CN	CP	M1	M2	AB1	AB2	MIXA	MIXAP
<i>S.aureus</i>	1	0,9	0,9	1,0	0,9	1,2	1,1	1,1	1,2
	14	0,5	0,7	0,6	0,5	1,0	0,6	0,8	1,1
<i>E.coli</i>	1	1,1	1,2	0,9	1,0	1,2	1,0	1,2	0,9
	14	0,8	1,0	0,7	0,7	0,8	1,0	0,9	1,2

Nota: CN – controlo negativo, CP – controlo positivo, M1 – Iogurte de melão 1, M2 – iogurte de melão 2; AB1 – iogurte de abóbora 1; AB2 – iogurte de abóbora; MIXA – iogurte com extratos de melão e abóbora; MIXAP – iogurte com extrato de melão e abóbora e ácido sórbico.

É interessante verificar que todos os iogurtes apresentaram inibição de ambas as estirpes de bactérias. De facto, a fermentação pelas bactérias no iogurte não só lhe permite desenvolver a sua textura característica, como lhe permite obter capacidades antimicrobianas. Durante a fermentação, as bactérias produzem produtos com efeito antimicrobiano, que incluem ácidos orgânicos como o ácido acético e o ácido láctico. Isto diminui o pH do meio, tornando-o pouco propício ao desenvolvimento de leveduras e bactérias. Adicionalmente, também produzem bactericidas e peróxido de hidrogénio (Liao & Nyachoti, 2017). Estudos revelam que, em média, o pH limite para a *E.coli* é de 3,9 e o da *S.aureus* é de 4,0 (Presser *et al.*, 1998) (Valero *et al.*, 2009). O valor de pH dos iogurtes, para o dia 1, foi entre 3,9 e 4,3, pelo que este fator pode explicar a inibição exibida. De facto, no dia 1, o iogurte (CN) que apresenta o valor de pH maior é o que regista o menor halo de inibição, e o com menor pH (MIXAP) é o que apresenta o maior halo de inibição para a *S.aureus*. É de salientar que o halo de inibição superior nos iogurtes com extrato e conservante pode indicar, por um lado, que a adição destas substâncias acídicas promoveu a

diminuição do pH e que, por outro lado, estes tiveram capacidade de produzir algum efeito antimicrobiano para além daquele proporcionado pelo meio. Isto pode ajudar a explicar também o facto do iogurte não apresentar contaminações por leveduras, bolores ou pela *E.coli*, como demonstram as imagens dos resultados que se encontram no Apêndice C, Figuras C.1.4 e C.1.5.

4.5 Avaliação do produto final

Por último, para determinar o interesse de consumidores neste tipo de produto, assim como a opinião sobre os iogurtes produzidos, foi desenvolvido um inquérito com uma amostra de 10 voluntários. Foi pedido que respondessem a algumas perguntas relativamente ao seu interesse em produtos com conservantes de origem natural e ao seu consumo de iogurtes. Por fim, os inquiridos provaram os iogurtes, e avaliaram-nos de 1 (pior classificação) a 5 (melhor), em termos de cor, odor, textura e sabor. Por fim, foi-lhes pedido para escolher o iogurte que preferiram. No Apêndice D, encontram-se as perguntas e respetivas respostas.

De facto, é possível verificar que existe interesse por parte dos inquiridos em produtos com aditivos de origem natural, sendo que 50 % dos inquiridos revelaram preferir um produto com conservantes de origem natural, ao invés de origem sintética.

Relativamente ao iogurte, verifica-se que é amplamente consumido, tendo apenas 20 % dos inquiridos respondido que o consomem uma vez por semana ou menos. O sabor e valor nutricional são os fatores com mais predominância na escolha, mas 80 % dos inquiridos revela-se disponível para abdicar do mesmo se o iogurte tiver incorporados conservantes de origem natural, ao invés de sintética.

Em geral, os inquiridos classificaram a cor dos iogurtes como apelativa, tendo, no entanto, os iogurtes em que ECM foi incorporada uma classificação inferior. Isto pode ser devido à cor esverdeada do iogurte que, em geral, é indesejada no que toca a alimentos láteos. Similarmente, os iogurtes incorporados com ECM apresentaram uma classificação inferior para o odor enquanto o cheiro a abóbora foi bem aceite. Relativamente à textura, os inquiridos preferiram os iogurtes que não incorporassem o extrato, provavelmente devido à viscosidade mais elevada. Por fim, o sabor a abóbora dos iogurtes incorporados com ECA agradou aos inquiridos, enquanto os incorporados com ECM não. De facto, os iogurtes com ECA apresentaram classificações semelhantes ao controlo negativo e controlo positivo, pelo que a adição deste extrato acrescentou um sabor agradável ao iogurte.

Por fim, foi pedido aos inquiridos para indicarem que iogurte seria mais provável adquirirem. Sem surpresa, atendendo ao anteriormente descrito, os iogurtes cujo ECA foi incorporado foram

os que apresentaram melhores classificações, pelo que estes parecem ser produtos de potencial interesse.

5 Conclusões

Este projeto teve por objetivo a avaliação dos extratos de casca de melão e abóbora como substitutos para os conservantes de origem sintética, neste caso o ácido sórbico, em iogurtes. Assim, começou-se por extrair os compostos das cascas de melão, realizando dois tipos diferentes de extrações sólido-líquido usando ultrassons seguida de Soxhlet. A extração sólido-líquido das cascas de abóbora foi realizada por recurso apenas a Soxhlet. Os rendimentos de extração obtidos foram 23,84 % e 39,78 %, para as cascas de melão e abóbora, respetivamente, sendo, portanto, o rendimento de extração das cascas de melão inferior ao de abóbora. No entanto, este rendimento não se traduziu num menor conteúdo fenólico para este extrato, obtendo-se $53,41 \text{ mg}_{\text{GAE}}\text{g}^{-1}_{\text{extrato}}$ para o extrato de casca de melão e $18,21 \text{ mg}_{\text{GAE}}\text{g}^{-1}_{\text{extrato}}$ para o extrato de casca de abóbora. Com isto foi possível concluir que, durante a extração dos Compostos BioActivos da casca de abóbora, nomeadamente compostos fenólicos, foram também extraídos outros compostos solúveis em etanol. Um maior conteúdo em compostos fenólicos permitiu ao extrato de casca de melão uma maior capacidade antioxidante, revelada por uma percentagem de inibição do DPPH de 62,85 %, um TEAC de $153,9 \mu\text{mol}_{\text{Trolox}}\text{g}^{-1}_{\text{extrato}}$ e um IC_{50} de $192,4 \text{ mg}_{\text{extrato}}\text{L}^{-1}$, quando comparado com os resultados do extrato de casca de abóbora, de uma percentagem de inibição do DPPH de 7,398 %, um TEAC de $41,91 \mu\text{mol}_{\text{Trolox}}\text{g}^{-1}_{\text{extrato}}$ e um IC_{50} de $698,0 \text{ mg}_{\text{extrato}}\text{L}^{-1}$. Relativamente à capacidade antimicrobiana, apenas o extrato de abóbora revelou efeito inibitório contra a *Staphylococcus aureus*. Não se verificou efeito inibitório de nenhum dos extratos para a *Escherichia coli*.

Os iogurtes incorporados com os extratos revelaram propriedades semelhantes ao do iogurte com o aditivo sintético, o ácido sórbico. Os primeiros apresentaram um valor de pH inicial inferior ao do iogurte sem nenhum aditivo, fruto da adição de compostos ácidos. Do dia 1 ao dia 14 dos ensaios, verificou-se um decréscimo do pH, consequência da produção de ácido láctico pelas bactérias, o que, conforme esperado, acabou por afetar o nível de sinérese, que aumentou para todos os iogurtes. Relativamente à viscosidade, os iogurtes incorporados com extratos revelaram viscosidades superiores, quando comparados com o iogurte com conservante sintético, muito provavelmente devido à adição de fibras e outros compostos com propriedades espessantes presentes nos extratos. O aquecimento do iogurte provocou uma diminuição irreversível da viscosidade, e todos apresentaram um comportamento de fluido pseudoplástico. Todos os iogurtes apresentaram conteúdo fenólico, resultado da produção de compostos secundários fenólicos durante a produção de ácido láctico pelas bactérias, sendo o iogurte com maior conteúdo fenólico o iogurte com uma mistura de ácido sórbico e extratos. No entanto, isto não se traduziu numa

maior capacidade antioxidante deste iogurte, sendo o iogurte com extrato de casca de melão o que acabou por apresentar maior capacidade antioxidante. Após a avaliação sensorial do iogurte, os iogurtes com extrato de casca de abóbora foram os preferidos por um painel de 10 voluntários.

Em suma, foi possível obter iogurtes incorporados com extratos de subprodutos agrícolas, que são candidatos a substituir os conservantes de origem sintética, como revelado pelas suas capacidades antioxidantes, antimicrobianas e capacidade de manter as características do iogurte estudadas estáveis durante um período de armazenamento de 14 dias. Adicionalmente, conseguiu-se um produto, enriquecido em compostos bioativos, ou seja, foi desenvolvido um produto de valor acrescentado, sustentável e com base na economia circular, que permite a reaplicação de subprodutos agrícolas e está de acordo com a recente procura dos consumidores por produtos saudáveis e sem aditivos de origem sintética. Seria no futuro interessante realizar uma avaliação dos custos associados ao processo, no sentido de perceber a viabilidade económica do mesmo, e possibilitar a sua otimização.

6 Avaliação do trabalho realizado

6.1 Objetivos Realizados

O trabalho desenvolvido cumpriu os objetivos inicialmente definidos. Foi possível desenvolver um produto de valor acrescentado, no qual se valorizou as cascas de melão e de abóbora. Os extratos obtidos foram avaliados e incorporados nos iogurtes, sendo estes sujeitos a testes de estabilidade, tendo sido verificado que os extratos seriam bons candidatos a substituir ou a diminuir concentração conservantes de origem sintética.

6.2 Trabalho futuro

Como trabalho futuro, sugere-se a procura de um método de secagem com uma melhor relação eficiência/custo. Acrescenta-se a otimização do processo de extração, nomeadamente aumentando o rendimento e permitindo a extração em maiores quantidades, para tornar o processo mais eficiente. Adicionalmente, seria interessante desenvolver um estudo sobre o efeito do solvente de extração, nomeadamente a utilização de misturas hidroalcoólicas (etanol e água).

Seria também interessante, para comparação, o desenvolvimento de outras técnicas de avaliação da capacidade antioxidante, como o ABTS, ORAC e FRAP.

Seria igualmente interessante uma análise aos extratos, para verificar a sua composição, através de, por exemplo, cromatografia líquida de alta *performance* HPLC/DAD ou cromatografia em fase líquida com detetor de espectrometria de massa, LC-MS, para concluir que compostos permitem as características apresentadas pelos extratos, tendo como compostos padrão os principais, ou seja os compostos fenólicos e os carotenóides.

Seria também importante identificar/quantificar os pesticidas que possam encontrar-se na superfície das cascas, provenientes de práticas agrícolas, e avaliar se estavam abaixo dos limites legais.

O desenvolvimento de ensaios toxicológicos e mais testes de estabilidade seria também importante, tendo em conta o objetivo de comercialização dos iogurtes. Por fim, o efeito da microencapsulação dos extratos seria etapa interessante, para permitir a libertação controlada dos compostos bioativos nos extratos e, ao mesmo tempo, protegê-los, permitindo assim maiores tempos de prateleiros dos produtos incorporados.

6.3 Apreciação Final

Este trabalho permitiu-me conhecer as características de um projeto de investigação, possibilitando-me a oportunidade de desenvolver novas competências e aprender e desenvolver diversas técnicas laboratoriais. Possibilitou-me também a oportunidade de produzir um produto desde o início, e de o fazer numa das áreas que mais interesse me desperta, dos produtos alimentares naturais e ecológicos. A oportunidade de criar um produto mais sustentável, e que permitiu contribuir para o reaproveitamento de desperdícios alimentares foi interessante e desafiante e permitiu melhorar os meus conhecimentos nesta área.

7 Referências

- Abóbora Butternut a ganhar terreno - Agroportal.* (n.d.). Retrieved April 17, 2022, from <https://www.agroportal.pt/abobora-butternut-a-ganhar-terreno/>
- Abusaloua, Dr. A., Mohamed, Dr. G., Ali, Eng. A., & Zahmol, Eng. W. (2019). Food additives and preservatives as slow poisons. *Scientific Journal of Applied Sciences of Sabratha University*, 2(3), 42–48. <https://doi.org/10.47891/SABUJAS.V2I3.42-48>
- Ahmad Wakid, S., & Azrin binti Harun, H. (2020). Antioxidant activity of melon fruit peel extracts. *Journal of Academia*, 8, 53–57.
- Alenisan, M. A., Alqattan, H. H., Tolbah, L. S., & Shori, A. B. (2017). Antioxidant properties of dairy products fortified with natural additives: A review. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*, 24, 101–106. <https://doi.org/10.1016/J.JAUBAS.2017.05.001>
- Ali, H., & Naz, N. (2017). Free radical scavenging activity of pulps Aand peels of some selected vegetables commonly used in Pakistan. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 30(1), 55–66.
- Amaro, A. L., Oliveira, A., & Almeida, D. P. F. (2015). Biologically Active Compounds in Melon: Modulation by Preharvest, Post-harvest, and Processing Factors. *Processing and Impact on Active Components in Food*, 165–171. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00020-2>
- Amirdivani, S., & Baba, A. S. (2011). Changes in yogurt fermentation characteristics, and antioxidant potential and in vitro inhibition of angiotensin-1 converting enzyme upon the inclusion of peppermint, dill and basil. *LWT - Food Science and Technology*, 44(6), 1458–1464. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2011.01.019>
- Andrade, M. A., Lima, V., Sanches Silva, A., Vilarinho, F., Castilho, M. C., Khwaldia, K., & Ramos, F. (2019). Pomegranate and grape by-products and their active compounds: Are they a valuable source for food applications? *Trends in Food Science & Technology*, 86, 68–84. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2019.02.010>
- Asghar, M. N., Shahzad, M. T., Nadeem, I., Chaudhry, &, & Ashraf, M. (2012). *Pharmaceutical Biology Phytochemical and in vitro total antioxidant capacity analyses of peel extracts of*

different cultivars of Cucumis melo and Citrullus lanatus.
<https://doi.org/10.3109/13880209.2012.717228>

Ayala-Zavala, J. F., Rosas-Domínguez, C., Vega-Vega, V., & González-Aguilar, G. A. (2010). Antioxidant Enrichment and Antimicrobial Protection of Fresh-Cut Fruits Using Their Own Byproducts: Looking for Integral Exploitation. *Journal of Food Science*, 75(8), R175. <https://doi.org/10.1111/J.1750-3841.2010.01792.X>

Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Technical Bulletin of the Registry of Medical Technologists*, 36(3), 49–52.

Bharat Helkar, P., Sahoo, A., & Patil, N. (2016). Review: Food Industry By-Products used as a Functional Food Ingredients. *Int J Waste Resour*, 6, 3. <https://doi.org/10.4172/2252-5211.1000248>

Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírseda, P., Marín-Arroyo, M. R., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204–209. <https://doi.org/10.1002/JSFA.6706>

Caleja, C., Barros, L., Antonio, A. L., Carocho, M., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Fortification of yogurts with different antioxidant preservatives: A comparative study between natural and synthetic additives. *Food Chemistry*, 210, 262–268. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.04.114>

Câmara, J. S., Albuquerque, B. R., Aguiar, J., Corrêa, R. C. G., Gonçalves, J. L., Granato, D., Pereira, J. A. M., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2021). Food Bioactive Compounds and Emerging Techniques for Their Extraction: Polyphenols as a Case Study. *Foods*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/FOODS10010037>

Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 377–399. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12065>

Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 284–295. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2015.06.007>

- Carotenoids* / Linus Pauling Institute / Oregon State University. (n.d.). Retrieved May 11, 2022, from <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/carotenoids>
- Cazarin, C. B. B., Bicas, J. L., Pastore, G. M., & Marostica Junior, M. R. (2022). Introduction. *Bioactive Food Components Activity in Mechanistic Approach*, 1–3. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823569-0.00004-7>
- Cho, W. Y., Kim, D. H., Lee, H. J., Yeon, S. J., & Lee, C. H. (2020). Quality characteristic and antioxidant activity of yogurt containing olive leaf hot water extract. *Http://Mc.Manuscriptcentral.Com/Tcyt*, 18(1), 43–50. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1640797>
- Dziuba, B., & Dziuba, M. (2014). Milk proteins-derived bioactive peptides in dairy products: molecular, biological and methodological aspects. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, 13(1), 5–25. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2014.1.1>
- Fontana, A. R., Antonioli, A., & Bottini, R. (2013). Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(38), 8987–9003. <https://doi.org/10.1021/JF402586F>
- Ganji, S. M., Singh, H., & Friedman, M. (2019). Phenolic Content and Antioxidant Activity of Extracts of 12 Melon (*Cucumis melo*) Peel Powders Prepared from Commercial Melons. *Journal of Food Science*, 84(7), 1943–1948. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14666>
- Gómez-García, R., Campos, D. A., Oliveira, A., Aguilar, C. N., Madureira, A. R., & Pintado, M. (2021). A chemical valorisation of melon peels towards functional food ingredients: Bioactives profile and antioxidant properties. *Food Chemistry*, 335. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.127579>
- González-García, S., Castanheira, É. G., Dias, A. C., & Arroja, L. (2012). *Environmental life cycle assessment of a dairy product: the yoghurt*. <https://doi.org/10.1007/s11367-012-0522-8>
- Hao, D. C., Gu, X.-J., & Xiao, P. G. (2015). Phytochemical and biological research of Cannabis pharmaceutical resources. *Medicinal Plants*, 431–464. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100085-4.00011-6>
- Hrnčič, M. K., Cör, D., Kotnik, P., & Knez, Ž. (2019). Extracts of White and Red Grape Skin and Rosehip Fruit: Phenolic Compounds and their Antioxidative Activity. *Acta Chim. Slov*, 66, 751–761. <https://doi.org/10.17344/acsi.2019.5253>

- Jerry O., O., Maduka V, A., Uchechukwu O, E., Kenneth I., O., O.O., O., Euslar N., O., Chidimma E., E., & Boniface, O. (2016). Isolation of Bacteria Contaminants from Tetra Packed Yoghurt. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 11(04), 75–77. <https://doi.org/10.9790/3008-1104027577>
- Kaderides, K., Kyriakoudi, A., Mourtzinos, I., & Goula, A. M. (2021). Potential of pomegranate peel extract as a natural additive in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 115, 380–390. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.06.050>
- Kamala Kumari, P., Akhila, S., Srinivasa Rao, Y., & Rama Devi, B. (2019). Alternative to Artificial Preservatives. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 10(1), 99–102. <https://doi.org/10.5530/srp.2019.1.17>
- Kulczynski, B., & Gramza-Michałowska, A. (2019). The profile of secondary metabolites and other bioactive compounds in cucurbita Pepo L. And cucurbita moschata pumpkin cultivars. *Molecules*, 24(16). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24162945>
- Kulczyński, B., Sidor, A., & Gramza-Michałowska, A. (2020). Antioxidant potential of phytochemicals in pumpkin varieties belonging to Cucurbita moschata and Cucurbita pepo species. *Http://Mc.Manuscriptcentral.Com/Tcyt*, 18(1), 472–484. <https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1778092>
- Lamy, E., Pinheiro, C., Rodrigues, L., Capela E Silva, F., Lopes, O. S., Tavares, S., & Gaspar, R. (2016). *Determinants of tannin-rich food and beverage consumption: oral perception vs. psychosocial aspects*.
- Lee, W. J., & Lucey, J. A. (2010). Formation and physical properties of yogurt. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(9), 1127–1136. <https://doi.org/10.5713/AJAS.2010.R.05>
- Leichtweis, M. G., Beatriz, M., Oliveira, P. P., Ferreira, I. C. F. R., Pereira, C., & Barros, L. (2021). *Sustainable Recovery of Preservative and Bioactive Compounds from Food Industry Bioresidues*. <https://doi.org/10.3390/antiox10111827>
- Liao, S. F., & Nyachoti, M. (2017). Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Animal Nutrition*, 3(4), 331–343. <https://doi.org/10.1016/J.ANINU.2017.06.007>
- Lignans / Linus Pauling Institute / Oregon State University*. (n.d.). Retrieved May 11, 2022, from <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/lignans>

- Mallek-Ayadi, S., Bahloul, N., & Kechaou, N. (2017). Characterization, phenolic compounds and functional properties of Cucumis melo L. peels. *Food Chemistry*, 221, 1691–1697. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.10.117>
- Mandal, D. (2019). Food preservative chemistry: Effects and side effects †. *J. Indian Chem. Soc*, 96, 1519–1528.
- Marić, M., Grassino, A. N., Zhu, Z., Barba, F. J., Brnčić, M., & Rimac Brnčić, S. (2018). An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. *Trends in Food Science & Technology*, 76, 28–37. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.03.022>
- Massa, T. B., Stevanato, N., Cardozo-Filho, L., & da Silva, C. (2019). Pumpkin (*Cucurbita maxima*) by-products: Obtaining seed oil enriched with active compounds from the peel by ultrasonic-assisted extraction. *Journal of Food Process Engineering*, 42(5), e13125. <https://doi.org/10.1111/JFPE.13125>
- Mathur, P., Ding, Z., Saldeen, T., & Mehta, J. L. (2015). *Reviews Tocopherols in the Prevention and Treatment of Atherosclerosis and Related Cardiovascular Disease*. <https://doi.org/10.1002/clc.22422>
- Mesías, F. J., Martín, A., & Hernández, A. (2021). Consumers' growing appetite for natural foods: Perceptions towards the use of natural preservatives in fresh fruit. *Food Research International*, 150, 963–9969. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2021.110749>
- Miao, P., Chen, S., Li, J., & Xie, X. (2020). Decreasing consumers' risk perception of food additives by knowledge enhancement in China. *Food Quality and Preference*, 79. <https://doi.org/10.1016/J.FOODQUAL.2019.103781>
- Morais, D. R., Rotta, E. M., Sargi, S. C., Schmidt, E. M., Bonafe, E. G., Eberlin, M. N., Sawaya, A. C. H. F., & Visentainer, J. v. (2015). Antioxidant activity, phenolics and UPLC–ESI(–)–MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. *Food Research International*, 77, 392–399. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.08.036>
- Morales-Castro, J., Langyan, S., Moreno, D. A., Fernando Ayala-Zavala, J., Redzwan Sabran, M., Qi Lau, K., & Raihanah Shafie, S. (2021). Utilization of Vegetable and Fruit By-products as Functional Ingredient and Food. *Frontiers in Nutrition | Www.Frontiersin.Org*, 1, 661693. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.661693>
- Mumba, F., & Tsige, M. (2007). Finding the density of objects without measuring mass and volume. *Physics Education*, 42(3), 293. <https://doi.org/10.1088/0031-9120/42/3/010>

- Najgebauer-Lejko, D., Witek, M., Żmudziński, D., & Ptaszek, A. (2020). Changes in the viscosity, textural properties, and water status in yogurt gel upon supplementation with green and Pu-erh teas. *Journal of Dairy Science*, *103*(12), 11039–11049. <https://doi.org/10.3168/JDS.2020-19032>
- Neglo, D., Tettey, C. O., Essuman, E. K., Kortei, N. K., Boakye, A. A., Hunkpe, G., Amah, F., Kwashie, P., & Devi, W. S. (2021). Comparative antioxidant and antimicrobial activities of the peels, rind, pulp and seeds of watermelon (*Citrullus lanatus*) fruit. *Scientific African*, *11*. <https://doi.org/10.1016/J.SCIAF.2020.E00582>
- Padmanabhan, P., Correa-Betanzo, J., & Paliyath, G. (2016). Berries and Related Fruits. *Encyclopedia of Food and Health*, 364–371. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00060-X>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, *5*, 1–15. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Patra, A., Abdullah, S., & Pradhan, R. C. (2022). Review on the extraction of bioactive compounds and characterization of fruit industry by-products. *Bioresources and Bioprocessing*, *9*(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/S40643-022-00498-3/TABLES/3>
- Phenolic Acid: Benefits and Where to Get Them in Your Diet*. (n.d.). Retrieved May 11, 2022, from <https://www.verywellfit.com/what-is-phenolic-acid-2507071>
- Possenti, M., Baima, S., Raffo, A., Durazzo, A., Giusti, A. M., & Natella, F. (2016). Glucosinolates in Food. *Glucosinolates*, 1–46. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26479-0_4-1
- Presser, K. A., Ross, T., & Ratkowsky, D. A. (1998). Modelling the Growth Limits (Growth/No Growth Interface) of *Escherichia coli* as a Function of Temperature, pH, Lactic Acid Concentration, and Water Activity. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(5), 1773. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.5.1773-1779.1998>
- Produção e comercialização de melão | MarketingAgricola.pt*. (n.d.). Retrieved April 17, 2022, from <https://marketingagricola.pt/producao-e-comercializacao-de-melao/>
- Rafaela Da Silva, T., Gomes Dos Reis, C., de Araújo Alves, J. E., & Ayala De Oliveira, C. (2017). *Elaboração e caracterização físico-química de iogurte adicionado de polpa do fruto do xique-xique (Pilosocereus gounellei)*.

- Raji, Z., Khodaiyan, F., Rezaei, K., Kiani, H., & Hosseini, S. S. (2017). Extraction optimization and physicochemical properties of pectin from melon peel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 709–716. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.01.146>
- Saavedra, M. J., Aires, A., Dias, C., Almeida, J. A., de Vasconcelos, M. C. B. M., Santos, P., & Rosa, E. A. (2015). Evaluation of the potential of squash pumpkin by-products (seeds and shell) as sources of antioxidant and bioactive compounds. *Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 1008–1015. <https://doi.org/10.1007/S13197-013-1089-5>
- Sadiku, M. N. O., Musa, S. M., & Ashaolu, T. J. (2019). Food Industry: An Introduction. *International Journal of Trend in Scientific Research and Development*, Volume-3(Issue-4), 128–130. <https://doi.org/10.31142/IJTSRD23638>
- Salami, A., Asefi, N., Kenari, R. E., & Gharekhani, M. (2021). Extraction of pumpkin peel extract using supercritical CO₂ and subcritical water technology: Enhancing oxidative stability of canola oil. *Journal of Food Science and Technology*, 58(3), 1101–1109. <https://doi.org/10.1007/S13197-020-04624-X>
- Sharif, Z., Mustapha, F., Jai, J., Mohd Yusof, N., & Zaki, N. (2017). Review on methods for preservation and natural preservatives for extending the food longevity. *Chemical Engineering Research Bulletin*, 19, 145. <https://doi.org/10.3329/CERB.V19I0.33809>
- Sharma, M., & Bhat, R. (2021). Extraction of Carotenoids from Pumpkin Peel and Pulp: Comparison between Innovative Green Extraction Technologies (Ultrasonic and Microwave-Assisted Extractions Using Corn Oil). *Foods 2021*, Vol. 10, Page 787, 10(4), 787. <https://doi.org/10.3390/FOODS10040787>
- Shofian, N. M., Hamid, A. A., Osman, A., Saari, N., Anwar, F., Dek, M. S. P., & Hairuddin, M. R. (2011). Effect of Freeze-Drying on the Antioxidant Compounds and Antioxidant Activity of Selected Tropical Fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(7), 4678. <https://doi.org/10.3390/IJMS12074678>
- Silva, A. M. T., Nouli, E., Xekoukoulotakis, N. P., & Mantzavinos, D. (2007). Effect of key operating parameters on phenols degradation during H₂O₂-assisted TiO₂ photocatalytic treatment of simulated and actual olive mill wastewaters. *Applied Catalysis B: Environmental*, 73(1–2), 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2006.12.007>
- Silva, M. A., Albuquerque, T. G., Alves, R. C., Oliveira, M. B. P. P., & Costa, H. S. (2020). Melon (*Cucumis melo* L.) by-products: Potential food ingredients for novel functional foods? *Trends in Food Science & Technology*, 98, 181–189. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.07.005>

- Taneva, I., & Zlatev, Z. (2020). *Total phenolic content and antioxidant activity of yoghurt with goji berries (lycium barbarum)*. *21*(1), 125–131.
- Tostes, J. B. de F., Nakamura, M. J., de Saboya, C. G. F., Mazzei, J. L., & Siani, A. C. (2016). Efficient and selective method to separate triterpene acids by direct treatment of apple peels with alkaline ethanol. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, *51*(12), 1986–1993. <https://doi.org/10.1080/01496395.2016.1200088>
- Umeyra Bakirci, S., Dagdemir, E., Seracettin Boran, O., & Hayaloglu, A. A. (2016). *The effect of pumpkin fibre on quality and storage stability of reduced-fat set-type yogurt*. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13264>
- Valero, A., Pérez-Rodríguez, F., Carrasco, E., Fuentes-Alventosa, J. M., García-Gimeno, R. M., & Zurera, G. (2009). Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. *International Journal of Food Microbiology*, *133*(1–2), 186–194. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2009.05.023>
- Vijaya Kumar, B., Vijayendra, S. V. N., & Reddy, O. V. S. (2015). Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(10), 6112–6124. <https://doi.org/10.1007/S13197-015-1795-2>
- Walstra, P., Walstra, P., Wouters, J. T. M., & Geurts, T. J. (2005). Dairy Science and Technology. *Dairy Science and Technology*. <https://doi.org/10.1201/9781420028010>
- York, G. K., & Vaughn, R. H. (1964). Mechanisms in the Inhibition of microorganisms by sorbic acid. *Journal of Bacteriology*, *88*(2), 411–417. <https://doi.org/10.1128/JB.88.2.411-417.1964>
- Younes, M., Aquilina, G., Castle, L., Engel, K. H., Fowler, P., Frutos Fernandez, M. J., Fürst, P., Gürtler, R., Gundert-Remy, U., Husøy, T., Mennes, W., Moldeus, P., Oskarsson, A., Shah, R., Wölflé, D., Lambré, C., Christodoulidou, A., & Waalkens-Berendsen, I. (2019). Opinion on the follow-up of the re-evaluation of sorbic acid (E200) and potassium sorbate (E202) as food additives. *EFSA Journal*, *17*(3), 5625. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2019.5625>
- Zajác, P., Zubrická, S., Čapla, J., Zelenáková, L., Židek, R., & Čurlej, J. (2016). Effect of preservatives on milk composition determination. *International Dairy Journal*, *61*, 239–244. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2016.06.008>
- Zawane Kamarudin, E., Uddin Ahmed, Q., Bashar Mohammed Helaluddin, A., Nazren Mohd Sirajudin, Z., Jalal Khan Chowdhury, A., & Professor, A. (2014). Studies on bactericidal efficacy of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne) peel. *Journal of Coastal Life of Medicine*, *2*(2), 146–153. <https://doi.org/10.12980/JCLM.2.201414J7>

Apêndice A – Produção dos extratos

A.1 Análise estatística

Os dados estatísticos foram avaliados através do cálculo da média aritmética, que consiste no quociente entre o somatório dos valores obtidos e o número de ensaios, e através do desvio-padrão associado à média aritmética, sendo este a medida de dispersão em torno da média populacional de uma variável aleatória. A média aritmética e o desvio padrão são dados pelas Equações A.1.1 e A.1.2, respetivamente.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \text{Equação A.1.1}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad \text{Equação A.1.2}$$

A.2 Extração dos Compostos Bioativos

Forno de secagem de vidro

Na Figura A.2.1 é apresentada a fotografia do forno de secagem de vidro utilizado na primeira fase de secagem das cascas de abóbora.

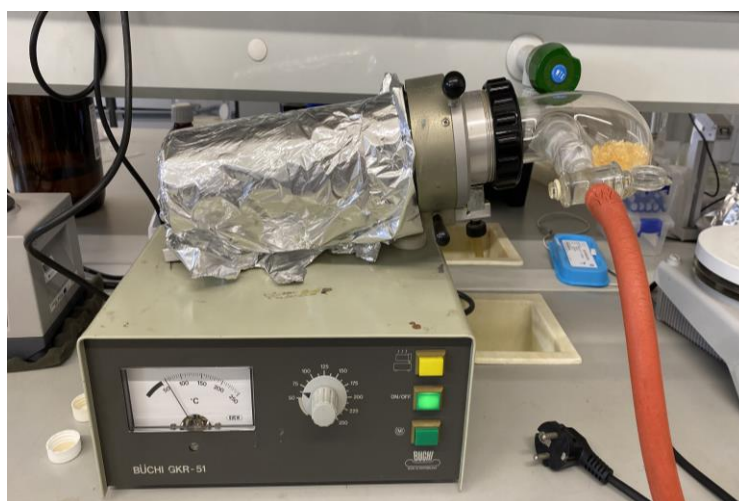


Figura A.2.1 Fotografia do forno de vidro usado no processo de secagem da casca de abóbora.

Secagem das cascas de melão e de abóbora

Na Figura A.2.2 encontram-se representadas por fotografias as cascas de melão e abóbora após a secagem.



Figura A.2.2 Fotografias das cascas de melão (A) e de abóbora (B), após a secagem.

A percentagem de resíduo seco, calculada através da Equação A.2.1, é importante para verificar a percentagem de água retirada da amostra inicial, pelo que $m_{\text{amostra fresca}}$ representa a massa da amostra antes da secagem e $m_{\text{amostra seca}}$ representa a massa de amostra após o processo de secagem.

$$\text{Resíduo seco (\%)} = \frac{m_{\text{amostra seca}}}{m_{\text{amostra fresca}}} \times 100 \quad \text{Equação A.2.1}$$

Rendimento de extração

A Figura A.2.3 exemplifica, através de uma fotografia, o processo de ESL com o extrator Soxhlet seguida da evaporação do solvente através do evaporador rotativo.

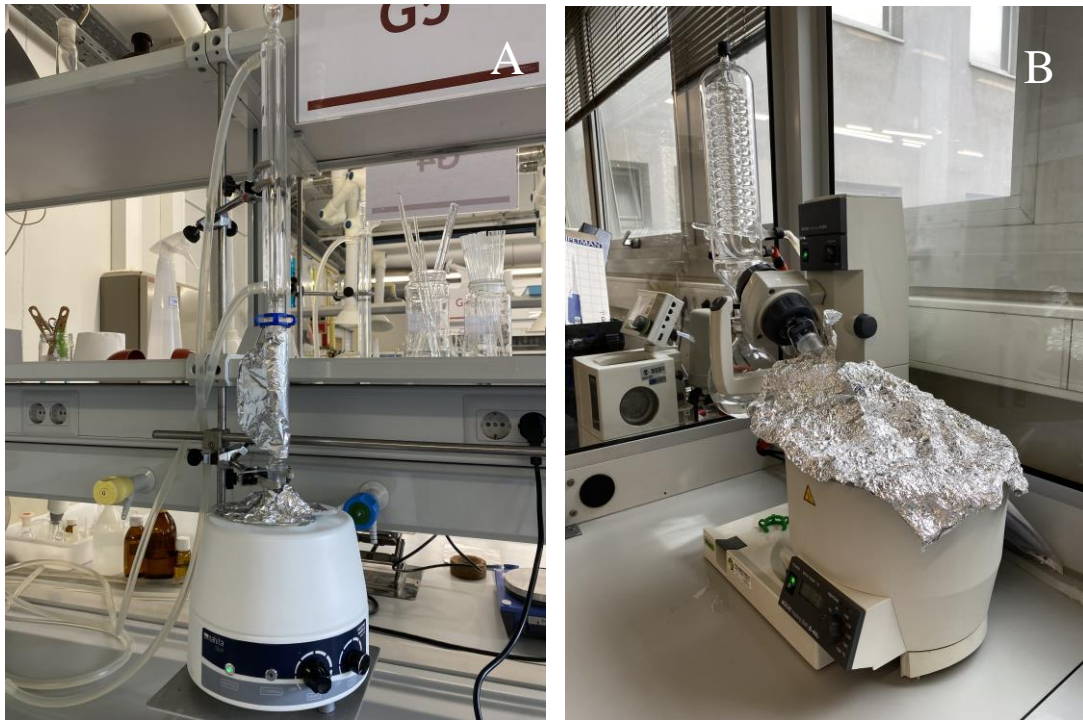


Figura A.2.3. Fotografia da montagem da extração com recurso ao Soxhlet (A) e da evaporação do solvente com o evaporador rotativo (B).

Rendimento de extração

O rendimento da extração é calculado através da massa inicial de cascas, m_{cascas} , e a massa do extrato final, m_{extrato} . É possível calcular este rendimento a partir da Equação A.2.2.

$$\text{Rendimento extração (\%)} = \frac{m_{\text{extrato}}}{m_{\text{cascas}}} \times 100 \quad \text{Equação A.2.2}$$

Assim, na Tabela A.2.1 é possível encontrar os valores para os rendimentos de extração das cascas de melão e, na Tabela A.2.2 os valores obtidos para os rendimentos de extração das cascas de abóbora, assim como os seus valores médios e desvio-padrão.

Tabela A.2.1. Rendimentos (%) obtidos na extração de cascas de melão.

Amostra	Razão A/S (m/V)	Massa casca (g)	Massa de extrato (g)	Rendimento (%)
1	1:20	2,5345	0,5856	23,10
2		2,4980	0,5670	22,70
3		2,5051	0,6440	25,71
$\bar{x} \pm \sigma$	-	2,51±0,02	0,60±0,03	24±1

Nota: Razão A/S – Razão amostra/solvente

Tabela A.2.2. Rendimentos (%) obtidos na extração de cascas de abóbora.

Amostra	Razão A/S (m/V)	Massa casca (g)	Massa de extrato (g)	Rendimento (%)
1	1:20	2,5456	0,9754	38,32
2		2,6286	1,0432	39,69
3		2,5034	1,0348	41,34
$\bar{x} \pm \sigma$	-	2,56±0,05	1,02±0,03	40±1

Nota: Razão A/S – Razão amostra/solvente

Apêndice B – Avaliação dos extratos

B.1 Determinação do conteúdo fenólico pelo método do reagente de Folin-Ciocalteu

O método do Reagente de Folin-Ciocalteu consiste na aferição da quantidade fenólica total de uma amostra, através da equivalência ao ácido gálico. Quando este reagente encontra um composto capaz de se reduzir, ocorre a reação, que leva a mudança de cor da solução de amarelo para azul. A representação esquemática da reação encontra-se na Figura B.1.1. Quanto mais intensa a coloração azul de uma solução, maior será a concentração em compostos oxidantes.

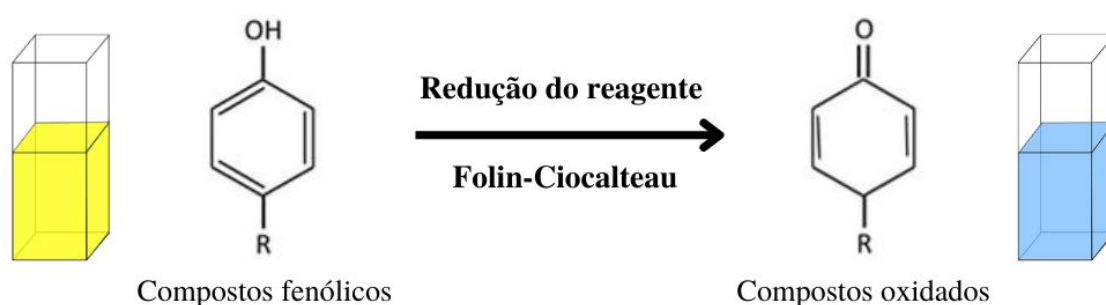


Figura B.1.1. Esquema da reação com o reagente de Folin-Ciocalteu.

Para desenvolver este método, foi necessário preparar 9 soluções em cuvets, um branco e 4 amostras para cada extrato, estando a composição das soluções representadas na Tabela B1.1. As amostras tinham uma concentração de 1 g L^{-1} e o carbonato de sódio de 333 g L^{-1} .

Tabela B.1.1. Volume de reagente (μL) utilizado na preparação das soluções do ensaio Folin-Ciocalteu.

Reagente	Água (μL)	Amostra (μL)	Carbonato de sódio (μL)	Reagente Folin-Ciocalteu (μL)
Branco	1600	-	300	100
Amostra	1580	20	300	100

A partir dos valores obtidos para absorvância, foi possível determinar a concentração fenólica de cada amostra em equivalentes a ácido gálico. Para isso, foi necessário construir a reta de calibração, com a concentração de ácido gálico (mg L^{-1}) em função da absorvância. A reta de calibração e respetiva representação encontram-se na Figura B.2.2 e na Equação B.1.1.

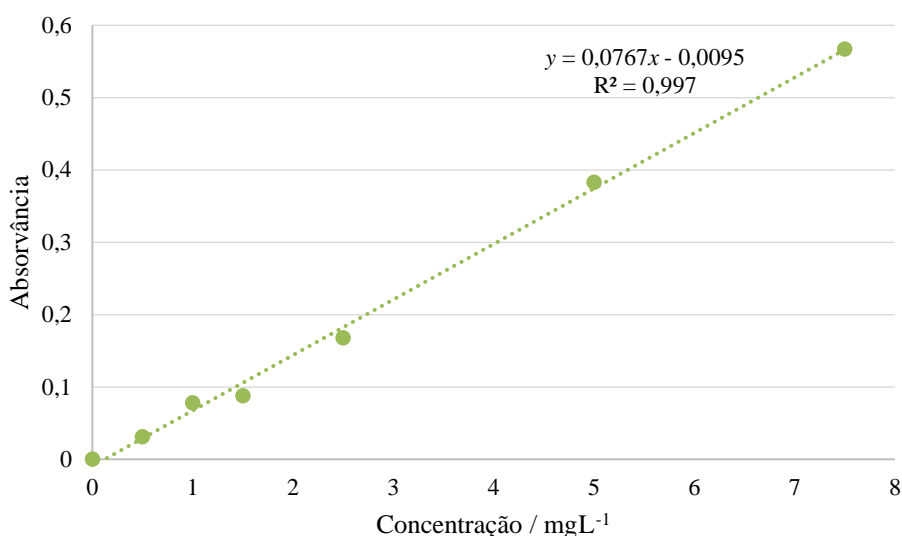


Figura B.1.2. Representação da reta de calibração da absorvância das amostras de ácido gálico, em função da concentração (mg L^{-1}).

A equação da reta de calibração obtida encontra-se na Equação B.1.1.

$$\text{Concentração}_{\text{ácido gálico}} = 0,0767 \times \text{absorvância} - 0,00950 \quad \text{Equação B.1.1}$$

Os valores de absorvância médios obtidos para a solução de extrato de melão e de abóbora, foram:

$$\text{Abs}_{\text{ECM}} = 3,167 \times 10^{-2}$$

$$\text{Abs}_{\text{ECA}} = 4,667 \times 10^{-3}$$

Finalmente, a partir destes valores foi possível obter a concentração de compostos fenólicos, em cada amostra de extrato, a partir da equação B.1.2,

$$\text{Concentração} = \frac{(\text{Abs}_{\text{extrato}} + 0,00950)}{0,0767} \times \frac{V_{\text{cuvete}}}{V_{\text{solução de amostra}}} \times 1000 \quad \text{Equação B.1.2}$$

em que o V_{cuvete} representa o volume total dentro da cuvete, de 2 mL, e $V_{\text{solução da amostra}}$ o volume de amostra dentro da cuvete, 20 μL , tendo sido obtidos os resultados em $\text{mg}_{\text{GAE}} \text{g}^{-1}_{\text{extrato}}$.

$$\text{Concentração}_{\text{ECM}} = 53,41 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{g}^{-1}_{\text{Extrato}}$$

$$\text{Concentração}_{\text{ECA}} = 18,21 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{g}^{-1}_{\text{Extrato}}$$

B.2 Determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH

O método do DPPH determina a capacidade que um antioxidante tem em reduzir o radical de DPPH•, através da transferência de um hidrogénio. O radical de DPPH é violeta, mas, quando se reduz, fica amarelo. Assim, a intensidade da cor amarela de uma solução de DPPH e amostra é um indicador da capacidade antioxidante da mesma. O esquema da reação encontra-se na Figura B.2.1, em que o antioxidante é representado por A-H, pois é nesta forma que normalmente se encontram os compostos fenólicos.

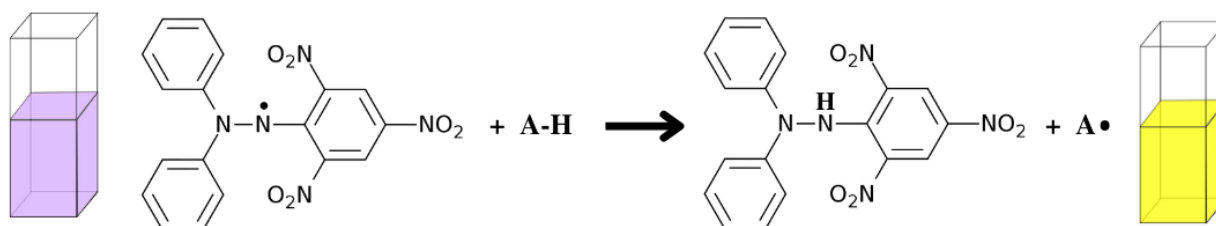


Figura B.2.1. Representação esquemática da reação de redução do DPPH.

Para se proceder a este método, foi necessário preparar uma microplaca de 96 poços para cada uma das amostras de extrato. O esquema da microplaca encontra-se na Figura B.2.2.

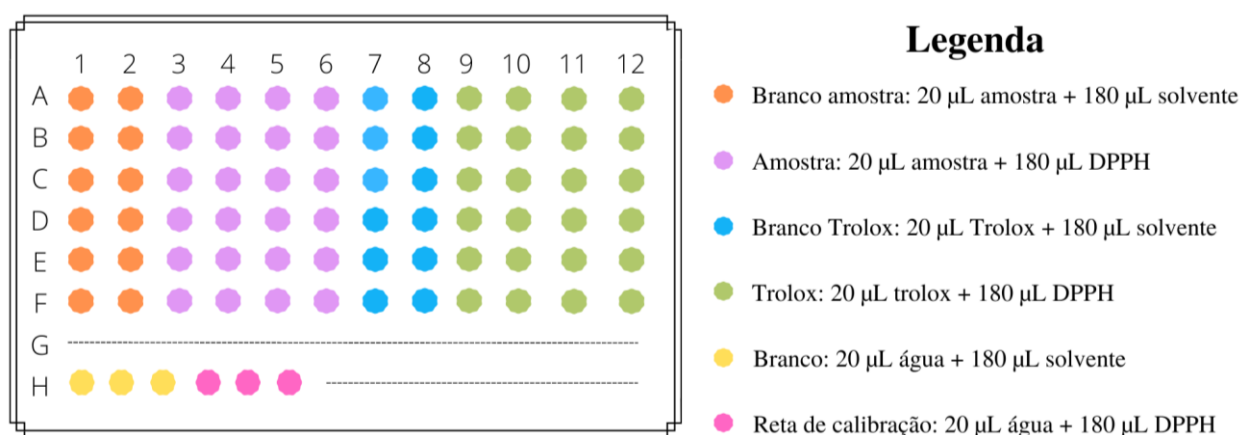


Figura B.2.2. Esquema da microplaca e respetiva legenda.

A concentração das amostras de extrato de melão e abóbora preparadas foram 2500 mg L^{-1} e 10000 mg L^{-1} , respetivamente. Como solvente foi utilizada uma solução de metanol e água, numa proporção de 4:1 (V/V).

A partir dos valores obtidos da absorvância a $\lambda=515 \text{ nm}$ para cada uma das placas, foi possível obter a percentagem de inibição (%), a $\text{IC}_{50} (\text{mg}_{\text{extrato}} \text{L}^{-1})$ e TEAC ($\text{mg}_{\text{Trolox}} \text{g}^{-1}_{\text{extrato}}$).

Primeiramente, calculou-se a percentagem de inibição de DPPH, através da Equação B.2.1.

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{A_{\text{controlo}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controlo}}} \times 100 \quad \text{Equação B.2.1}$$

Sendo que A_{amostra} é a absorvância dos poços com amostra e A_{controlo} é a absorvância dos poços com apenas solvente e DPPH.

Assim, a partir desta equação, foi possível obter os valores da percentagem de inibição de DPPH, para cada concentração de amostra, resultados que se encontram representados na Tabela E.

Tabela B.2.1. Percentagem de inibição do DPPH (%) cada concentração de extrato.

ECM		ECA	
Concentração (mgL ⁻¹)	Inibição (%)	Concentração (mgL ⁻¹)	Inibição (%)
250	62,85	1000	75,22
150	40,61	750	20,12
100	39,41	500	13,56
50	27,24	250	7,40
25	14,12	100	5,37
15	8,33	75	2,20
10	7,56	50	0,45

Posteriormente, para aferir a concentração inibitória média, IC₅₀, desenvolveu-se uma reta de calibração para cada amostra, com a percentagem de inibição de DPPH em função da concentração. Esta reta encontra-se representada na Figura B.2.3.

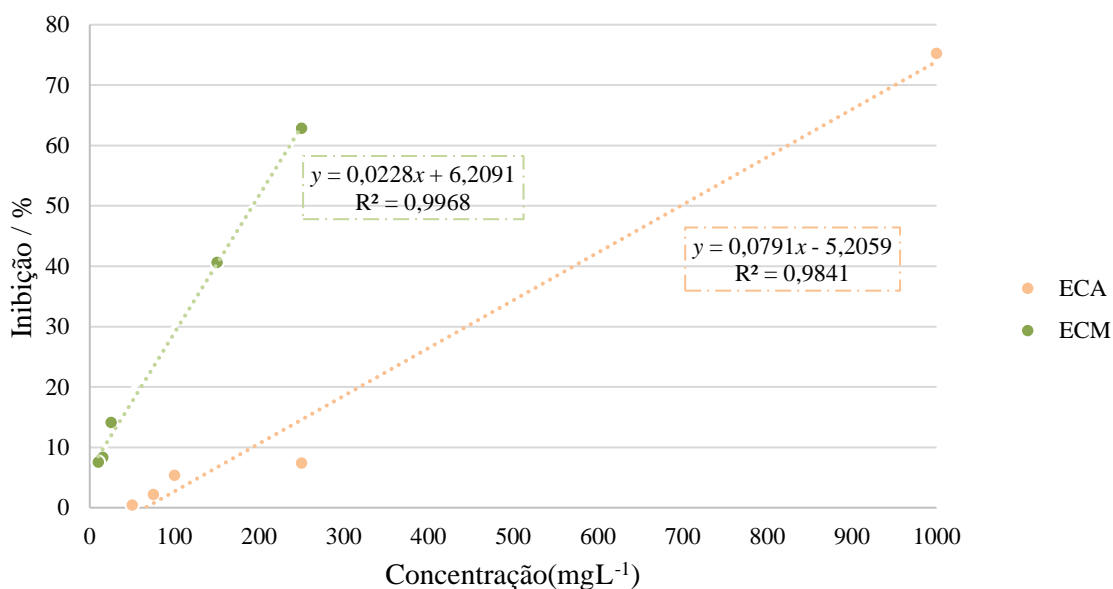


Figura B.2.3. Representação da reta de calibração da percentagem de inibição de DPPH, em função da concentração (mgL^{-1}), para o ECM e para o ECA.

Assim, foi possível obter a concentração de inibição média segundo a Equação B.2.2,

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{a} \quad \text{Equação B.2.2}$$

a partir do declive, a , e da ordenada na origem, b , para cada reta, foi possível obter os resultados para o IC_{50} , para os extratos de ambas as cascas.

$$IC_{50 \text{ ECM}} = 192,39 \text{ mg}_{\text{extrato}} \text{ L}^{-1}$$

$$IC_{50 \text{ ECA}} = 697,97 \text{ mg}_{\text{extrato}} \text{ L}^{-1}$$

O valor 50 representa o eixo das ordenadas, visto que o IC_{50} é definido como a concentração para a qual a percentagem de inibição é 50 %.

Finalmente, para determinar a TEAC, foi determinado o IC_{50} do Trolox, pelo mesmo método descrito. A reta de calibração do trolox encontra-se representada na Figura B.2.4.

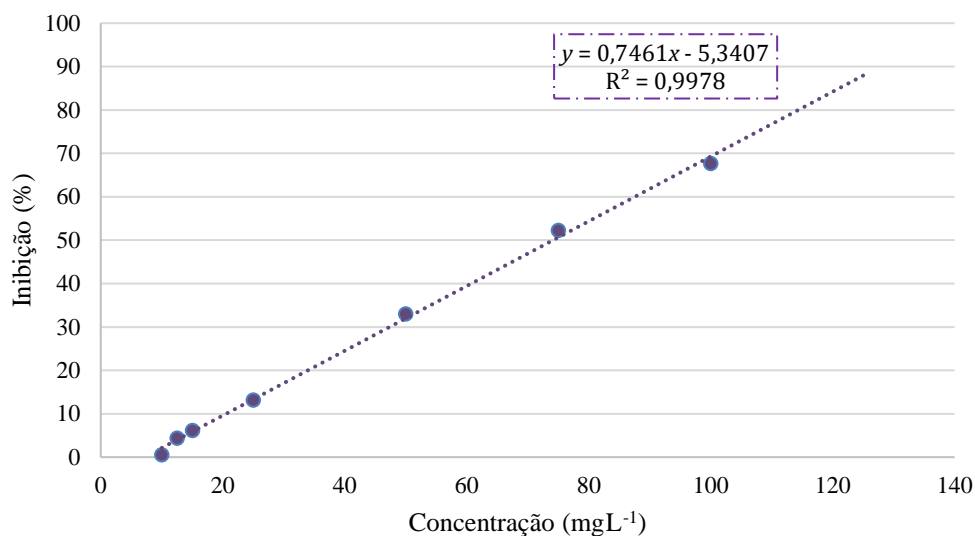


Figura B.2.4. Representação da reta de calibração da percentagem de inibição de DPPH, em função da concentração (mgL^{-1}), para a solução de trolox.

$$IC_{50 \text{ Trolox}} = 7,417 \text{ mg}_{\text{Trolox}} \text{ L}^{-1}$$

Assim, tendo em conta a massa molar do Trolox ($250,59 \text{ g mol}^{-1}$), obtém-se o TEAC para o ECM e o ECA, a partir da Equação B.2.3,

$$TEAC = \frac{IC_{50 \text{ Trolox}}}{IC_{50 \text{ extrato}}} \cdot \frac{1}{MM_{\text{Trolox}}} \cdot 1000 \quad \text{Equação B.2.3}$$

Em que o $IC_{50 \text{ Trolox}}$ representa a concentração inibitória média do Trolox, $IC_{50 \text{ extrato}}$, a concentração inibitória média do extrato e MM_{Trolox} a massa molar do Trolox, tendo-se obtido os resultados em $mg_{\text{Trolox}} g^{-1}_{\text{extrato}}$.

$$TEAC_{ECM} = 153,85 \mu mol_{\text{trolox}} g_{\text{extrato}}^{-1}$$

$$TEAC_{ECA} = 41,91 \mu mol_{\text{trolox}} g_{\text{extrato}}^{-1}$$

B.3 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos foi verificada através de antibiogramas realizados a partir do método da difusão em disco, para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Na Tabela B.3.1 encontram-se os valores obtidos para os halos de inibição para cada um dos extratos e bactérias. É de salientar que, para o valor dos halos para o controlo positivo, ácido sórbico, e controlo negativo, água ultrapura, foram selecionados 3 valores mais parecidos dos 4 obtidos para cada bactéria.

Tabela B.3.1. Diâmetro dos halos de inibição obtidos (cm), para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e para concentrações de 500 mgL⁻¹ e 1000 mgL⁻¹ de extrato.

Bactéria	d _{halo} (cm)						
	Extrato				Controlos		
	ECM		ECA		ácido sórbico		água ultrapura
500 (mgmL ⁻¹)	1000 (mgmL ⁻¹)	500 (mgmL ⁻¹)	1000 (mgmL ⁻¹)	500 (mgmL ⁻¹)	1000 (mgmL ⁻¹)		
<i>S.aureus</i>	<0,9	<0,9	<0,9	0,9	<0,9	1,2	<0,9
	<0,9	<0,9	<0,9	1,0	<0,9	1,1	<0,9
	<0,9	<0,9	<0,9	1,0	<0,9	1,0	<0,9
$\bar{x} \pm \sigma$	<0,9 ± 0,0	<0,9 ± 0,0	<0,9 ± 0,0	0,93 ± 0,05	<0,9 ± 0,0	1,10 ± 0,08	<0,9 ± 0,0
<i>E.coli</i>	<0,9	<0,9	<0,9	<0,9	<0,9	1,4	<0,9
	<0,9	<0,9	<0,9	<0,9	<0,9	1,3	<0,9
	<0,9	<0,9	<0,9	<0,9	<0,9	1,4	<0,9
$\bar{x} \pm \sigma$	<0,9 ± 0,0	<0,9 ± 0,0	<0,9 ± 0,0	<0,9 ± 0,0	<0,9 ± 0,0	1,33 ± 0,05	<0,9 ± 0,0

Nota: ECM - Extrato de casca de melão, ECA – Extrato de casca de abóbora

A notação <0,9 é referente aos ensaios em que não foi possível medir o halo de inibição

Apêndice C – Avaliação dos iogurtes

C.1 Ensaios de estabilidade

Durante os ensaios de estabilidade, foram necessários equipamentos, como é caso o medidor de pH e o reômetro, para determinar a viscosidade dos iogurtes, em função da taxa de deformação, e a viscosidade em função da temperatura. Na figura C.1.1 encontram-se as montagens de ambos os equipamentos a ser utilizados.



Figura C.1.1. Fotografia dos equipamentos utilizados nos ensaios de estabilidade, o reômetro (A) e o medidor de pH (B).

Relativamente aos ensaios do pH e da sinérese, realizados nos dias 1 e 14 após a produção dos iogurtes, os resultados podem ser verificados na Tabela C.1.1.

Tabela C.1.1 Valores de pH e sinérese (%) obtidos para os iogurtes, para os dias 1 e 14.

Iogurte	Dia	pH	Sinérese (%)
CN	1	4,24	27,23
	14	3,8	31,63
CP	1	3,98	16,98
	14	3,82	18,16
M1	1	3,96	11,46
	14	3,91	13,72
M2	1	3,93	14,35
	14	3,77	18,31

Iogurte	Dia	pH	Sinérese (%)
AB1	1	4,00	12,98
	14	3,78	14,95
AB2	1	4,02	23,76
	14	3,85	24,54
MIXA	1	4,01	13,79
	14	3,73	17,39
MIXAP	1	3,90	12,13
	14	3,76	14,23

Nota: CN – controlo negativo, CP – controlo positivo, M1 – iogurte de melão 1, M2 – iogurte de melão 2; AB1 – iogurte de abóbora 1; AB2 – iogurte de abóbora; MIXA – iogurte com extratos de melão e abóbora; MIXAP – iogurte com extrato de melão e abóbora e ácido sórbico

Em relação à viscosidade, a curva representativa, em escala logarítmica, da viscosidade em função da taxa de deformação, para cada iogurte, encontra-se na Figura C.1.2 e C.1.3.

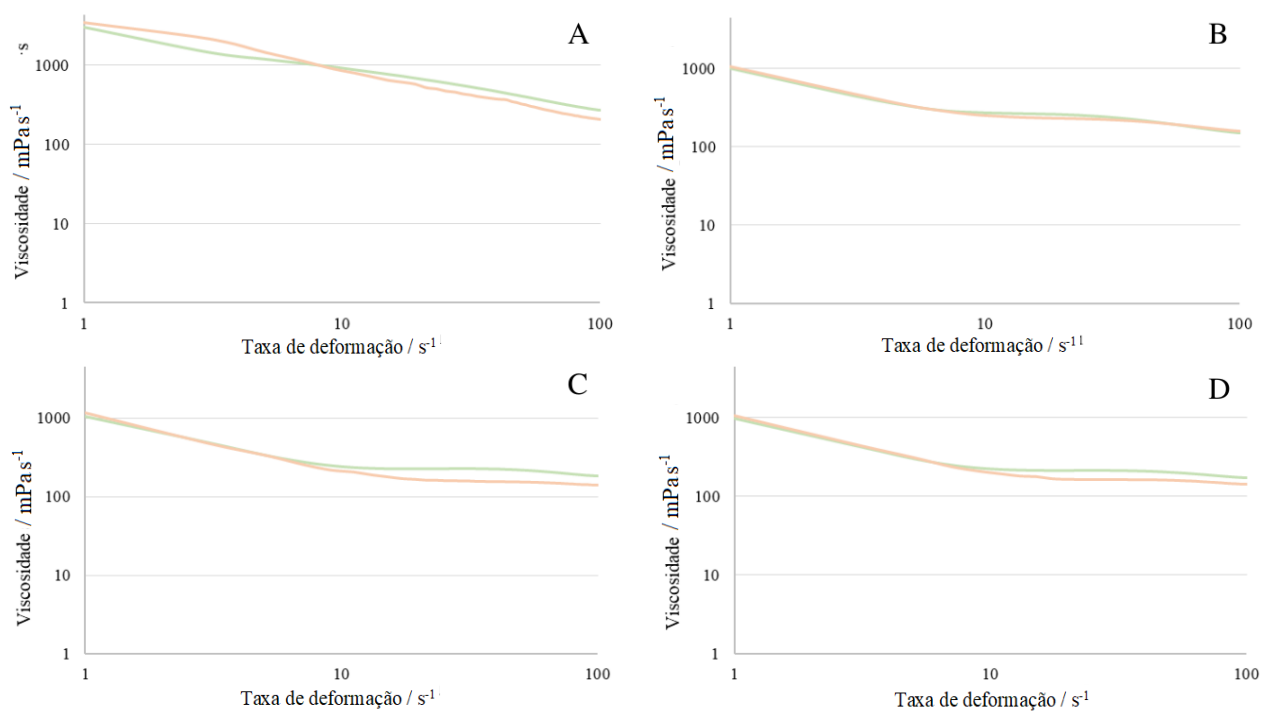


Figura C.1.2. Resultados para a viscosidade aparente (mPa s^{-1}) em função da taxa de deformação (s^{-1}), em escala logarítmica, para os iogurtes CN (A), CP (B), M1 (C), M2 (D), para os dias 1 e 14.

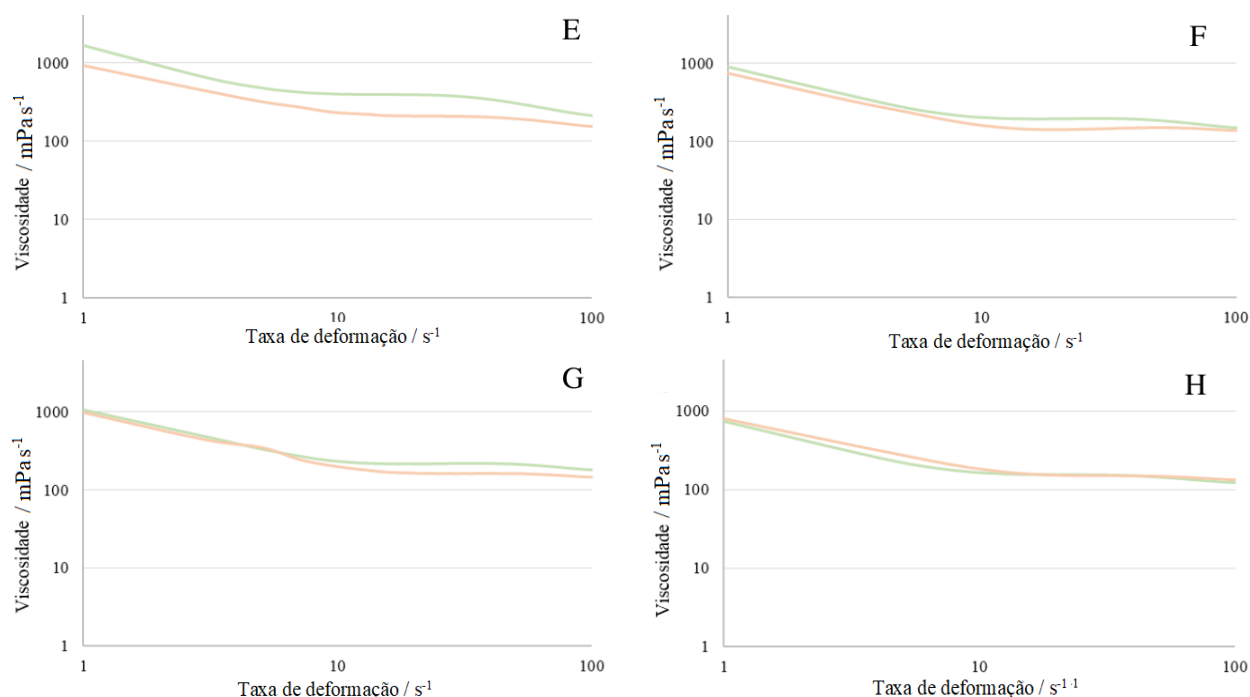


Figura C.1.3. Resultados para a viscosidade aparente ($\text{mPa}\cdot\text{s}^{-1}$) em função da taxa de deformação (s^{-1}), em escala logarítmica, para os iogurtes AB1 (E), AB2 (F), MIXA (G), MIXAP (H), para os dias 1 e 14.

Com o objetivo de determinar o índice de potência (n), utilizou-se o Modelo de Lei da Potência, representada na Equação C.1.1,

$$\eta = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1} \quad \text{Equação C.1.1}$$

em que η é viscosidade em função da taxa de deformação, $\dot{\gamma}$, e K é o índice de consistência.

O n é indicador do comportamento do fluido:

$n < 1$ Fluido pseudoplástico

$n = 1$ Fluido newtoniano

$n > 1$ Fluido dilatante

Assim, a partir da curva da viscosidade em função da taxa de deformação é possível determinar a linha de tendência em exponencial, o que permite obter o K e $(n-1)$. Finalmente, o n é calculado.

Os resultados do K , $(n-1)$ e n encontram-se resumidos na Tabela C.1.2.

Tabela C.1.2. Índice de consistência (mPasⁿ) e índice do comportamento do fluido para os iogurtes, nos dias 1 e 14.

Iogurte	Dia	K (mPas ⁿ)	$n-1$	n
CN	1	3030,50	-0,52	0,48
	14	3824,80	-0,64	0,36
CP	1	686,59	-0,32	0,68
	14	618,29	-0,30	0,70
M1	1	545,90	-0,25	0,75
	14	544,66	-0,32	0,68
M2	1	501,14	-0,24	0,76
	14	501,85	-0,29	0,71
AB1	1	1089,30	-0,34	0,66
	14	543,24	-0,28	0,72
AB2	1	462,81	-0,25	0,75
	14	332,94	-0,21	0,79
MIXA	1	525,22	-0,24	0,76
	14	474,15	-0,28	0,72
MIXAP	1	378,32	-0,26	0,75
	14	414,52	-0,27	0,73

Nota: CN – controlo negativo, CP – controlo positivo, M1 – Iogurte de melão 1, M2 – iogurte de melão 2; AB1 – iogurte de abóbora 1; AB2 – iogurte de abóbora; MIXA – iogurte com extratos de melão e abóbora; MIXAP -iogurte com extrato de melão e abóbora e ácido sórbico.

Os ensaios antimicrobianos caracterizam-se pela formação de um halo de inibição em torno do poço com iogurte. Os resultados encontram-se na Tabela C.1.3.

Tabela C.1.3 Valores dos halos de inibição (cm) para os iogurtes, para as duas bactérias estudadas, nos dias 1 e 14

Bactéria	Dia	d_{halo} (cm)							
		Iogurtes							
		CN	CP	M1	M2	AB1	AB2	MIXA	MIXAP
<i>S.aureus</i>	1	0,8	0,9	0,9	1,0	1,2	0,9	1,1	1,5
		1,0	1,0	1,0	1,1	1,3	1,1	1,1	1,0
		0,8	0,9	1,0	0,7	1,0	1,3	1,2	1,1
	\bar{x}	0,87	0,93	0,97	0,9	1,2	1,1	1,13	1,2
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	σ	0,09	0,05	0,05	0,2	0,1	0,1	0,05	0,2
	14	0,5	0,8	0,5	0,5	0,9	0,8	0,9	1,0
		-	0,7	0,7	0,5	1,0	0,5	1,0	1,1
		0,5	0,7	0,5	-	1,0	0,5	0,5	1,2
	\bar{x}	0,5	0,77	0,57	0,5	0,97	0,6	0,8	1,1
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	σ	0,0	0,05	0,09	0,0	0,05	0,1	0,2	0,2
<i>E.coli</i>	1	0,9	1,5	0,9	1,2	1,0	0,9	1,1	1,0
		1,1	1,3	0,8	1,0	1,1	1,1	1,1	0,9
		1,3	0,9	0,9	0,8	1,4	1,0	1,3	0,9
	\bar{x}	1,1	1,2	0,87	1,0	1,2	1,00	1,17	0,93
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	σ	0,1	0,3	0,05	0,2	0,2	0,08	0,09	0,05
	14	1,0	1,0	0,5	0,5	0,8	1,1	1,1	1,2
		1,0	1,0	0,8	0,8	0,8	1,0	0,8	1,0
		0,8	1,0	0,8	0,7	-	0,9	0,9	1,4
	\bar{x}	0,93	1,0	0,7	0,7	0,8	1,00	0,9	1,20
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	σ	0,09	0,0	0,1	0,1	0,0	0,08	0,1	0,16

Nota: CN – controlo negativo, CP – controlo positivo, M1 – Iogurte de melão 1, M2 – iogurte de melão 2; AB1 – iogurte de abóbora 1; AB2 – iogurte de abóbora; MIXA – iogurte com extratos de melão e abóbora; MIXAP – iogurte com extrato de melão e abóbora e ácido sórbico.

A notação <0,9 é referente aos ensaios em que não foi possível medir o halo de inibição.

Adicionalmente, foram realizados ensaios para verificar se os iogurtes poderiam conter contaminações por leveduras, bolores ou por *E.coli*. Os iogurtes foram inoculados sobre placas com meio LSA e RBC, e colocados na incubadora durante 24 h. Os resultados do dia 1 encontram-se na Figura C.1.4 e os resultados do dia 14 encontram-se na Figura C.1.5.

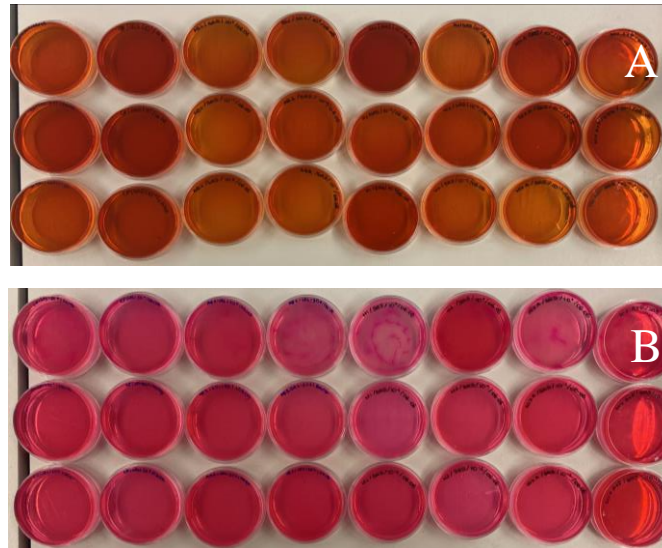


Figura C.1.4 Fotografia dos meios LSA (A) e RBC (B) inoculados com os iogurtes, no dia 1.

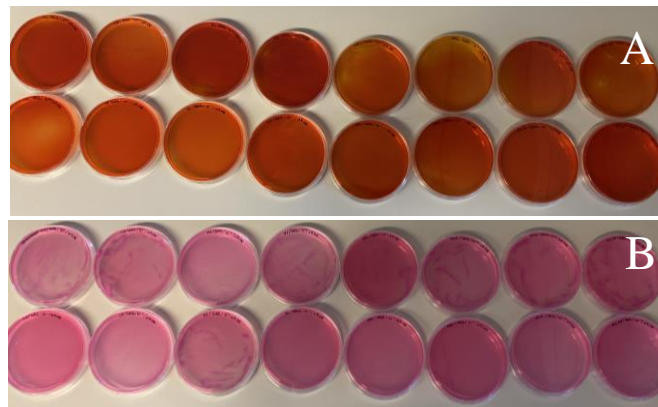


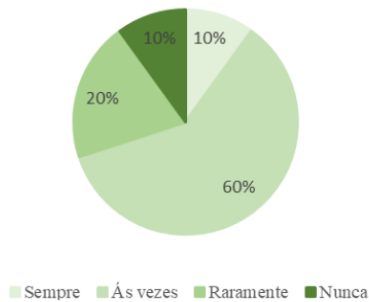
Figura C.1.5 Fotografia dos meios LSA (A) e RBC (B) inoculados com os iogurtes, no dia 14.

Apêndice D - Questionário



Figura D.1 Distribuição da amostra por base de gênero (A) e idade (B)

Verifica a lista de ingredientes antes da compra?



A origem dos conservantes (natural ou sintética) é um fator a ter em conta na escolha dos alimentos?

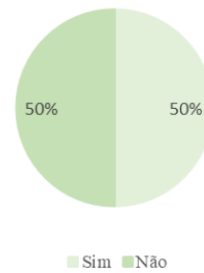


Figura D.2 Respostas às perguntas 3 e 4, relativas à preocupação dos inquiridos sobre conservantes de origem sintética.

Com que frequência come iogurte?



Qual o fator mais importante na escolha do iogurte?



Figura D.3 Respostas às perguntas 5 e 6, relativamente ao consumo de iogurte dos inquiridos.

Estaria disposto a abdicar do fator mais importante que selecionou anteriormente de um iogurte com conservante de origem sintética em prol de um iogurte com conservantes de origem natural?

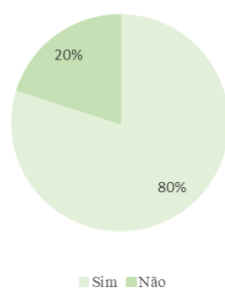


Figura D.4 Resposta à pergunta 7, relativamente à importância do conservante de origem natural.

Encontra-se disposto a experimentar os iogurtes e avaliar os mesmos?

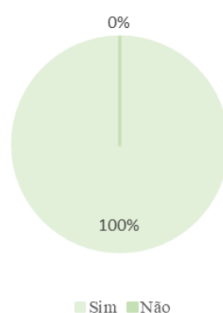


Figura D.5 Resposta à pergunta 8, relativamente à disponibilidade dos inquiridos em experimentar os iogurtes e a responder a perguntas sobre os mesmos.

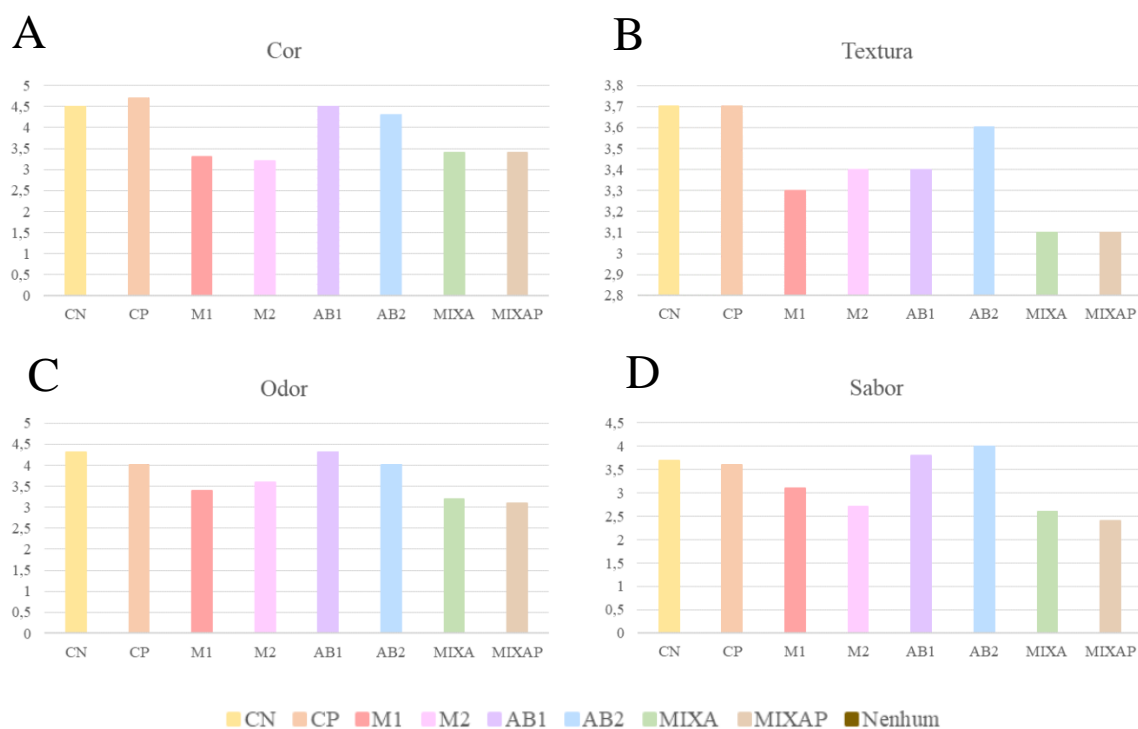


Figura D.6 Respostas relativas às características dos iogurtes produzidos, cor (A), textura (B), odor (C) e sabor (D).

Após a prova, qual seria o iogurte mais provável de adquirir?

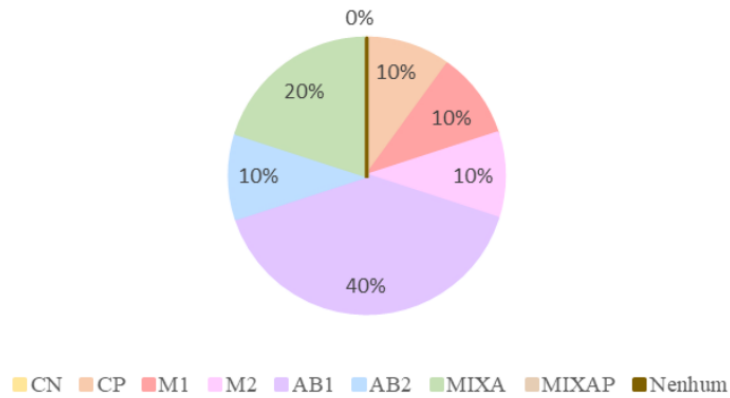


Figura D.7 Resposta à pergunta 38, sobre a possibilidade de aquisição de um dos iogurtes.