



Alimentos Sustentáveis e Funcionais para um Coração Saudável

ANA CATARINA FÉLIX NOGUEIRA

novembro de 2022

Alimentos Sustentáveis e Funcionais para um Coração Saudável



Ana Catarina Félix Nogueira

Mestrado em Biorrecursos

2021/2022

Alimentos Sustentáveis e Funcionais para um Coração Saudável

Setembro 2022

Autor:

Ana Catarina Félix Nogueira

Orientadores:

Professora Doutora Maria João Ramalhosa | ISEP – REQUIMTE/LAQV

Doutora Cristina Soares | ISEP – REQUIMTE/LAQV

Doutora Clara Grosso | ISEP – REQUIMTE/LAQV



Grupos de Reação e Análises Químicas (GRAQ) – Laboratório Associado para a Química Verde (LAQV) da REQUIMTE

Instituto Superior de Engenharia do Porto

**Dissertação Submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Biorrecursos**

Agradecimentos

Alcançando o desfecho de uma importante etapa na minha vida académica, não poderia deixar de agradecer o precioso contributo a todos aqueles que tornaram possível a concretização deste meu grande objetivo.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer em especial às minhas orientadoras, que foram sem sombra de dúvidas o meu maior pilar durante todo este percurso. O meu muito obrigada à Doutora Cristina Soares e Doutora Clara Grosso pela incansável dedicação e acompanhamento ao longo destes últimos meses, elogiando especialmente a paciência e disponibilidade constante que tiveram sempre comigo. Agradeço ainda à Professora Doutora Maria João Ramalhosa, pela sua amabilidade e predisposição em ajudar sempre que foi necessário.

Não poderia deixar de expressar o meu agradecimento também à Técnica de laboratório Aurora Silva, especialmente pelas nossas conversas e piadas malucas que alegravam o meu dia, assim como pelo seu bom humor matinal, estando sempre receptiva a auxiliar-me nas minhas dificuldades.

Gostaria também de agradecer o companheirismo e espírito de entreajuda dos colegas que também realizaram o mestrado no GRAQ.

Por último, um agradecimento a toda a minha família e amigos que sempre me acompanharam e motivaram ao longo desta etapa, em especial aos meus pais pela oportunidade e confiança que me proporcionaram.

Resumo

Com a viragem do século, as doenças cardiovasculares (DCV) continuam a ser principal causa de mortalidade no mundo e em Portugal, sendo encaradas atualmente como um dos mais importantes problemas de saúde pública. Como resposta a esta situação e em combinação com os avanços em diversos domínios científicos, surgiu um novo tipo de produtos alimentares, denominados alimentos funcionais. Estes produtos, cujo desenvolvimento aumentou consideravelmente ao longo da última década, além da função nutricional básica que possuem, oferecem também aos consumidores uma gama de compostos bioativos com efeitos benéficos e cardioprotetores para a saúde, reduzindo desta forma o risco de doenças DCV.

Este trabalho teve como objetivo principal desenvolver uma bebida funcional substituta de café a partir de duas matrizes vegetais desvalorizadas e altamente disponíveis em Portugal, a bolota e a alfarroba. Para tal, foi necessário processar as amostras de forma a obter no final três bebidas funcionais, B1 (nem muito doce nem muito amarga), B2 (mais amarga) e B3 (mais doce), cada uma com diferentes formulações de bolota e alfarroba torradas, que se enquadrassem no gosto dos consumidores de café ou substitutos de café. De forma a avaliar os benefícios nutricionais e potenciais efeitos cardioprotetores para a saúde, foram efetuadas uma série de análises às bebidas desenvolvidas assim como também às matrizes cruas e às respetivas torras usadas para a preparação das bebidas.

Neste sentido, foi realizada uma análise à composição química e nutricional das amostras: humidade/sólidos totais, cinzas, lípidos, proteínas, açúcares, fibras insolúveis, minerais e valor energético; foram avaliados, com recurso à espectrofotometria, os teores de compostos fenólicos totais (TPC), flavonoides totais (TFC), taninos condensados, produtos da reação de *Maillard* e atividade de sequestro dos radicais livres DPPH[•] e o ABTS^{•+}, e por último foi feita uma análise à bioatividade através do estudo da capacidade de inibição das enzimas α -glucosidase e α -amilase. As bebidas foram ainda analisadas sensorialmente através de um inquérito efetuado a um grupo de 20 provadores não treinados, de forma a avaliar as características organoléticas dos produtos finais.

Os resultados obtidos mostraram que as matrizes possuem um elevado valor nutricional, nomeadamente alto teor em fibras insolúveis, cerca de $19,0 \pm 2,5\%$ para a bolota e $31,3 \pm 4,0\%$ para a alfarroba, no entanto a alfarroba apresentou teores mais elevados em açúcares totais ($31,3 \pm 4,0\%$) quando comparado com outros frutos secos (castanha, amêndoa e avelã). Todas as amostras apresentaram capacidade antioxidante, comprovada essencialmente através dos seus altos teores em compostos fenólicos e de capacidade de sequestro dos radicais livres, nomeadamente o radical ABTS^{•+}. Deste modo, a bolota foi a matriz que obteve valores mais altos, cerca de 1551 ± 6 mg EAG/100 g de teor em TPC e apresentou um valor de IC₅₀ para a atividade de sequestro do ABTS^{•+} de $6,04 \pm 0,15$ μ g/mL, enquanto a alfarroba obteve valores de 859 ± 19 mg EAG/100 g e 203 ± 5 μ g/mL, respetivamente. Em relação às bebidas, a B2 foi a que apresentou valores superiores de TPC, cerca de $275 \pm 1,1$ mg EAG/100 g, seguindo-se da B1 e B3 com os respetivos valores de $236 \pm 1,1$ mg EAG/100 g e $212 \pm 1,6$ mg EAG/100 g, por outro lado, a B3 (IC₅₀ = $83,0 \pm 2,1$ μ g/mL) obteve valores mais elevados para a atividade de sequestro do ABTS^{•+}, seguido da B2 (IC₅₀ = $65,7 \pm 2,7$ μ g/mL) e B3 (IC₅₀ = $65,3 \pm 0,3$ μ g/mL). Em termos de bioatividades todas as amostras mostraram serem potenciais agentes antidiabéticos, uma vez que os extratos mostraram uma forte inibição da α -glucosidase, apresentando valores de IC₅₀ entre $5,36 - 217$ μ g/mL. No entanto, não foram registadas quaisquer inibições para a α -amilase.

Através da análise sensorial realizada, concluiu-se que os provadores tiveram mais preferência pela bebida B3, de seguida da B2 e por último a B1. Apesar de os provadores terem mostrado que não tinham muita intenção de comprar alguma das bebidas, a B3 foi a que obteve maior pontuação.

Deste modo, este trabalho conseguiu mostrar o elevado valor nutricional das matrizes escolhidas, que se refletiu posteriormente na produção de bebidas funcionais, destacando-se a sua capacidade na prevenção e diminuição do risco de DCV, comprovando que estas bebidas poderão ser uma potencial alternativa ao café.

Palavras-chave: Sustentabilidade; doenças cardiovasculares; alimentos funcionais; valorização; bolota; alfarroba.

Abstract

With the turn of the century, cardiovascular diseases (CVD) continue to be the leading cause of mortality in the world and Portugal is currently seen as one of the most critical public health problems. In response to this situation and advances in various scientific fields, a new type of food product called functional foods emerged. These products, whose development has increased considerably over the last decade, in addition to their primary nutritional function, also offer consumers a range of bioactive compounds with beneficial and cardioprotective effects on health, thus reducing the risk of CVD diseases.

The main objective of this work was to develop a functional coffee substitute from two undervalued and highly available vegetable matrices in Portugal, acorns and carob. For this, it was necessary to process the samples in order to obtain, in the end, three functional drinks, B1 (neither too sweet nor too bitter), B2 (more bitter) and B3 (sweeter), each with different formulations of acorns and roasted carob, which fit the taste of coffee or coffee substitute consumers. Furthermore, to assess the nutritional benefits and potential cardioprotective effects on health, a series of analyses were carried out on the drinks developed, the raw matrices, and the respective roasts used to prepare the drinks.

In this sense, an analysis of the chemical and nutritional composition of the samples was carried out: moisture/total solids, ash, lipids, proteins, sugars, insoluble fibres, minerals and energy value; total phenolic compounds (TPC), total flavonoids (TFC), condensed tannins, *Maillard* reaction products and free radical scavenging activity DPPH[•] and ABTS^{•+} were evaluated using spectrophotometry, and finally, an analysis of the bioactivity was performed by studying the ability to inhibit α -glucosidase and α -amylase enzymes. In addition, the drinks were also analyzed sensorially through a survey with a group of 20 untrained tasters to assess the organoleptic characteristics of the final products.

The results showed that both the matrices have a high nutritional value, highlighting their high levels of insoluble fibre, around $19.0 \pm 2.5\%$ for acorn and $31.3 \pm 4.0\%$ for carob. However, carob had higher contents of total sugars ($31.3 \pm 4.0\%$) when compared to other nuts (chestnut, almond and hazelnut). Furthermore, all samples showed antioxidant capacity, proven essentially through their high levels of phenolic compounds and free radical scavenging capacity, in particular ABTS^{•+}. Thus, acorn was the matrix that obtained the highest values, about 1551 ± 6 mg GAE/100 g of TPC content and presented an IC_{50} value for ABTS^{•+} scavenging activity of 6.04 ± 0.15 μ g/mL, while carob obtained values of 859 ± 19 mg GAE/100 g and 203 ± 5 μ g/mL, respectively. Regarding the drinks, B2 showed the highest TPC values, around 275 ± 1.1 mg GAE/100 g, followed by B1 and B3 with respective values of 236 ± 1.1 mg GAE/100 g and $212 \pm 1, 6$ mg GAE/100 g, on the other hand, B3 ($IC_{50} = 83.0 \pm 2.1$ μ g/mL) obtained the highest values for scavenging activity ABTS^{•+}, followed by B2 ($IC_{50} = 65.7 \pm 2.7$ μ g/mL) and B3 ($IC_{50} = 65.3 \pm 0.3$ μ g/mL). Regarding bioactivities, all samples showed their potential as antidiabetic agents since the extracts showed strong inhibition of α -glucosidase, presenting IC_{50} values between $5.36 - 217$ μ g/mL. However, no inhibitions for α -amylase were recorded.

The results showed that both the matrices and the drinks have a high nutritional value, highlighting their high levels of insoluble fibre in the matrices and the low energy value present in the drinks. In addition, all samples showed antioxidant capacity, proven essentially through their high levels of phenolic compounds and ability to scavenge free radicals, namely the ABTS^{•+} radical. Regarding bioactivities, all samples showed their potential as antidiabetic agents since the extracts showed strong inhibition of α -glucosidase. However, no inhibitions for α -amylase were recorded.

Through the sensory analysis, it was concluded that the tasters had a greater preference for beverage B3, followed by B2 and B1. Even though the tasters showed that they had no intention of buying any of the drinks, B3 was the one with the highest score.

This work showed the high nutritional value of the chosen matrices, which was later reflected in the production of functional drinks, highlighting their ability to prevent and reduce the risk of CVD, proving that these drinks could be a potential alternative to coffee.

Keywords: Sustainability; cardiovascular diseases; functional foods; valorization; acorns; carob.

Índice geral

1. Introdução	1
1.1. Tema e objetivos	1
1.2. Organização da dissertação	1
2. Fundamentos teóricos	2
2.1. Doenças cardiovasculares	2
2.2. A indústria agroalimentar	5
2.2.1. Alimentos funcionais com efeitos cardioprotetores	6
2.2.2. Processamento de alimentos	9
2.2.2.1. Vantagens e Desvantagens do Processamento	10
2.2.3. Segurança e higiene alimentar	11
2.2.4. Valorização de subprodutos agroalimentares	13
2.3. A Bolota	15
2.3.1. Composição e valor nutricional	17
2.3.2. Processamento e potenciais aplicações em produtos alimentares	19
2.4. A Alfarroba	22
2.4.1. Composição e valor nutricional	23
2.4.2. Processamento e potenciais aplicações em produtos alimentares	26
3. Parte Experimental	30
3.1. Amostras e preparação para processamento e análise	30
3.2. Reagentes	31
3.3. Processamento das bebidas funcionais e Análise sensorial preliminar	31
3.4. Determinação da composição química e nutricional	36
3.4.1. Humidade e sólidos totais	36
3.4.2. Cinzas (matéria inorgânica)	37
3.4.3. Lípidos totais	38
3.4.4. Proteínas	39
3.4.4.1. Proteínas totais nas amostras sólidas	39
3.4.4.2. Proteínas solúveis totais	41

3.4.5. Extração de Compostos bioativos (compostos fenólicos, açúcares totais e taninos)....	42
3.4.6. Açúcares totais.....	43
3.4.7. Fibras insolúveis.....	43
3.4.8. Minerais (Ca, K, Mg e Na).....	44
3.4.9. Valor energético.....	45
3.5. Avaliação da atividade antioxidante.....	45
3.5.1. Compostos fenólicos.....	45
3.5.1.1. Teor de fenólicos totais (TPC).....	45
3.5.1.2. Teor de flavonoides totais (TFC).....	46
3.5.1.3. Taninos condensados.....	47
3.5.2. pH e Produtos da reação de <i>Maillard</i>	48
3.5.3. Método de sequestro de DPPH'.....	50
3.5.4. Método de sequestro de ABTS ⁺	51
3.6. Análise da bioatividade.....	52
3.6.1. Ensaio de inibição da α -Glucosidase.....	52
3.6.2. Ensaio de inibição da α -Amilase.....	54
3.7. Análise sensorial.....	56
3.8. Análise estatística.....	56
4. Resultados e Discussão.....	57
4.1. Composição química e nutricional.....	57
4.1.1. Minerais (Ca, K, Mg e Na).....	61
4.1.2. Valor energético das bebidas funcionais.....	66
4.2. Análise da atividade antioxidante.....	67
4.2.1. Quantificação dos compostos fenólicos.....	67
4.2.2. pH e Produtos da reação de <i>Maillard</i>	70
4.2.3. Atividade de sequestro do radical DPPH' e ABTS ⁺	75
4.3. Análise da bioatividade.....	79
4.3.1. Inibição da α -Glucosidase.....	79
4.3.2. Inibição da α -Amilase.....	81

4.4. Análise sensorial hedónica.....	83
5. Conclusões.....	91
Lista de Referências	94
6. Anexos	104
A – Determinação das proteínas solúveis totais (Bradford)	104
A.1 – Curva de calibração de BSA.....	104
B – Determinação dos açúcares totais	105
B.1 – Curva de calibração de glicose	105
C – Determinação do teor de minerais	106
C.1 – Curvas de calibração para a determinação dos minerais (Ca, K, Mg e Na)	106
D – Determinação do teor de taninos condensáveis	107
D.1 – Curva de calibração de catequina.....	107
E – Determinação do teor compostos fenólicos.....	108
E.1 – Curva de calibração de ácido gálico para a determinação do teor de fenólicos totais (TPC)	108
E.2 – Curva de calibração de epicatequina para a determinação flavonoides totais (TFC).....	109
F – Determinação da capacidade antioxidante pelo método de sequestro de DPPH[•] e ABTS^{•+}	110
F.1 – Curva de calibração do trolox para o método de sequestro de DPPH[•]	110
F.2 – Curva de calibração do trolox para o método de sequestro de ABTS^{•+}	111
G – Estudo da bioatividade.....	112
G.1 – Atividade da α-Glucosidase	112
G.2 – Atividade da α-Amilase.....	113
H – Resultados da Correlação de Pearson	114
I – Análise Sensorial.....	120

Índice de Figuras

Figura 1. Principais causas de morte a nível mundial ao longo dos anos. Adaptado de (Ulster University, 2021).....	2
Figura 2. Principais causas de morte na UE em 2016. Adaptado de (Eurostat, 2019).....	3
Figura 3. Percentagem das principais causas de morte, entre homens e mulheres, em Portugal no ano de 2012 (Rocha & Nogueira, 2015).	4
Figura 4. Representação da distribuição das espécies <i>Quercus</i> mais comuns identificadas em Portugal (a verde nos mapas) Adaptado de (Tiago, 2019).....	16
Figura 5. Constituição morfológica da bolota (Bento, 2020).	17
Figura 6. Distribuição geográfica do cultivo da alfarroba a nível mundial (a preto no mapa) e nacional (a verde no mapa). Adaptado de (Batlle, & Tous, 1997; UTAD, 2022).	23
Figura 7. Constituição da vagem da alfarroba (Pessoa, 2013).	24
Figura 8. Pré-tratamento da bolota e da alfarroba.	30
Figura 9. Torra e pó obtido das bolotas processadas: A) B15 e B) B30.	32
Figura 10. Torra e pó obtido das alfarrobas processadas: A) A10; B) A20 e C) A30.....	32
Figura 11. Demonstração dos testes sensoriais preliminares: A) Preparação para a extração das amostras; e B) Prova das bebidas teste.....	35
Figura 12. Bebidas preparadas para análise: A – B1 (50%B30 + 25%A30 + 25%A10); B – B2 (75%B30 + 25%A30); C – B3 (50%A10 + 25%A30 + 25%B30); D – CEV; E – CF.....	35
Figura 13. Secagem em estufa: A) Amostras sólidas após secagem; B) Bebidas após secagem.	36
Figura 14. Incineração seca: A) Amostras sólidas após incineração; B) Bebidas após incineração.	37
Figura 15. Extração dos lípidos: A) Filtração da solução contendo amostra; B) Tubo rotavapor com o conteúdo lipídico.	38
Figura 16. Método Kjeldahl: A) Digestor de aquecimento; B) Unidade de destilação; C) Ponto de equivalência da titulação	40
Figura 17. Representação esquemática das microplacas utilizadas para a determinação das proteínas solúveis. Legenda: Linha A – brancos; Linhas B e C – padrões (do menos concentrado ao mais concentrado); e Linhas D-H – amostras (menos concentradas (coluna 1) até às mais concentradas (coluna 12)).....	42
Figura 18. Representação esquemática das microplacas utilizadas para a determinação dos açúcares totais. Legenda: Linha A – brancos; Linhas B-D – padrões (do menos concentrado ao mais concentrado); Linha E – Brancos das amostras; Linhas F-H – amostras menos concentradas (coluna 1) até às mais concentradas (coluna 12).	43
Figura 19. Extração a quente em refluxo das fibras insolúveis.	44

Figura 20. Representação esquemática das microplacas usadas para a determinação do TPC. Legenda: Linha A – brancos; Linha B e C – padrões (do menos concentrado ao mais concentrado); Linha D-H – amostras menos concentradas (coluna 1) até às mais concentradas (coluna 12).....	46
Figura 21. Representação esquemática das microplacas usadas para a determinação do TFC. Legenda: Linha A – brancos; Linha B e C – padrões (do menos concentrado ao mais concentrado); Linha D – brancos das amostras; Linhas E-H – amostras menos concentradas (coluna 1) até às mais concentradas (coluna 12).....	47
Figura 22. Representação esquemática das microplacas usadas para a determinação dos taninos condensados. Legenda: Linha A – brancos; Linha B e C – padrões (do menos concentrado ao mais concentrado); Linha D – brancos das amostras; Linhas E-H – amostras menos concentradas (coluna 1) até às mais concentradas (coluna 12).	48
Figura 23. Soluções preparadas das amostras sólidas para medição de pH e para a determinação dos produtos da reação de <i>Maillard</i> : A – Bolota; B – Alfarroba; C – A10; D – A30; E – B30.	48
Figura 24. Representação esquemática das microplacas utilizadas para a determinação dos produtos da reação de <i>Maillard</i> . Legenda: Linha A – brancos (H ₂ O ultrapura); Linhas B e H – amostras (menos concentradas (coluna 1) até às mais concentradas (coluna 12).	49
Figura 25. Representação esquemática das microplacas utilizadas para o método DPPH. Legenda: Linha A – Controlo negativo (não tem amostra); Linhas B e C – padrões (do menos concentrado ao mais concentrado); Linhas D-H – amostras (menos concentradas (coluna 1) até às mais concentradas (coluna 12).....	51
Figura 26. Representação esquemática das microplacas utilizadas para o método ABTS. Legenda: Linha A – Brancos; Linhas B e C – padrões (do menos concentrado ao mais concentrado); Linha D – brancos das amostras; Linhas E-H – amostras (menos concentradas (coluna 1) até às mais concentradas (coluna 12).....	52
Figura 27. Reação de conversão de 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosido em p-nitrofenol e glucose. Adaptado de Louro (2014).	53
Figura 28. Representação esquemática das microplacas utilizadas para os ensaios de inibição da α -glucosidase. Legenda: Linha H – controlo negativo (sem amostra); Linhas A-G – amostra em triplicado (mais concentradas (linha A) até à menos concentradas (linha G).	53
Figura 29. Esquema da reação da conversão do amido em maltose e redução do DNS. Adaptado de Dangkulwanich et al. (2018)	54
Figura 30. Representação esquemática das microplacas utilizadas para os ensaios de inibição da α -amilase. Legenda: Linha H – controlo negativo (sem amostra); Linhas A-G – amostra em triplicado (mais concentradas (linha A) até à menos concentradas (linha G).....	55
Figura 31. Espectros obtidos dos produtos da reação de <i>Maillard</i> presentes nas amostras: A1/A2 – Bolota e B30; B1/B2 – Alfarroba, A30 e A10; e C1/C2 – bebidas: B1, B2, B3, CF e CEV.	71

Figura 32. Produtos da reação de *Maillard* e índice de acastanhamento para as amostras em estudo: A) Bolota e B30; B) Alfarroba, A10 e A30; C) Bebidas – B1, B2, B3, CF e CEV. Os resultados estão expressos como média \pm DP de duas experiências. Para cada comprimento de onda e entre índices de acastanhamento, letras diferentes correspondem a diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), 73

Figura 33. Inibição da α -glucosidase pelos extratos analisados: A) Bolota e B30; B) Alfarroba, A30 e A10; e C) Bebidas – B1, B2 e B3. Os resultados mostram a média \pm SEM de três experiências, realizadas em triplicado, para as amostras do gráfico B e média \pm SD de pelo menos três experiências independentes para as restantes amostras dos gráficos A e C. 80

Figura 34. Resumo das respostas dadas à aparência (A), aroma (B) e sabor (C) da B1. 84

Figura 35. Resumo das respostas dadas à aparência (A), aroma (B) e sabor (C) da B2. 85

Figura 36. Resumo das respostas dadas à aparência (A), aroma (B) e sabor (C) da B3. 86

Índice de Tabelas

Tabela 1. Principais compostos bioativos presentes em alguns alimentos funcionais e os seus respetivos benefícios (Pereira, 2014, Hofmann et al., 2018; Moreira, 2012).....	7
Tabela 2. Perigos de origem alimentar e respetivos exemplos de alimentos e potenciais doenças associados (ASAE, 2009).....	12
Tabela 3. Composição química e valor nutricional da bolota (Silva et al. 2016; Szablowska, 2021; Vinha et al, 2016c).	18
Tabela 4. Composição química e valor nutricional da alfarroba (Avallone et al.,1997; Batlle, & Tous, 1997; Duarte, 2018; Loullis & Pinakoulaki, 2018).....	25
Tabela 5. Diferentes graus de torra estudados para a bolota e alfarroba.	31
Tabela 6. Testes sensoriais preliminares das bebidas individuais.	33
Tabela 7. Testes sensoriais preliminares de algumas das formulações testadas.	34
Tabela 8. Resultados obtidos para a composição química e nutricional das amostras sólidas.....	57
Tabela 9. Resultados obtidos para a composição química e nutricional das amostras líquidas.	60
Tabela 10. Resultados obtidos para os minerais das amostras sólidas.	62
Tabela 11. Resultados obtidos para os minerais das amostras líquidas.....	63
Tabela 12. Teor de sal, rácio Na/K e Ca/Mg das amostras sólidas em análise.	64
Tabela 13. Teor de sal, rácio Na/K e Ca/Mg das bebidas em análise.	64
Tabela 14. Dose de cálcio numa bebida de 35mL e a sua contribuição para a DDR.	65
Tabela 15. Dose de potássio numa bebida de 35mL e a sua contribuição para a DDR.	65
Tabela 16. Dose de magnésio numa bebida de 35mL e a sua contribuição para a DDR.	65
Tabela 17. Dose de sódio numa bebida de 35mL e a sua contribuição para a DDR.	66
Tabela 18. Valores de energia das bebidas preparadas.	66
Tabela 19. Valores obtidos para o conteúdo em fenólicos totais (TPC), flavonoides totais (TFC) e taninos condensados presentes nas amostras sólidas.....	68
Tabela 20. Valores obtidos para o conteúdo em fenólicos totais (TPC), flavonoides totais (TFC) e taninos condensados presentes nas bebidas funcionais desenvolvidas.....	69
Tabela 21. Produtos finais de glicação avançada (AGEs) formados durante a reação de <i>Maillard</i> das amostras.....	74
Tabela 22. Valores de pH obtidos de todas as amostras em análise.....	75
Tabela 23. Valores obtidos para o sequestro do DPPH [•] e do ABTS ^{•+} das amostras sólidas.	76
Tabela 24. Valores obtidos para o sequestro do DPPH [•] e do ABTS ^{•+} das bebidas.	76
Tabela 25. Valores obtidos para a atividade de sequestro do ABTS.....	78
Tabela 26. Inibição da α -glucosidase pelos extratos analisados e pela acarbose (controlo positivo). ..	80

Tabela 27. Médias das respostas dadas pelos participantes às notas de cada parâmetro organolético (aparência, aroma e sabor) e da aceitação global e intenção de compra de bebida.	87
Tabela 28. Correlação entre os diferentes parâmetros analisados para a B1.	88
Tabela 29. Correlação entre os diferentes parâmetros analisados para a B2.	88
Tabela 30. Correlação entre os diferentes parâmetros analisados para a B3.	89

Nomenclatura

ABTS⁺ – radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-acidosulfónico)

ADI – Ingestão diária aceitável

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

AVC – Acidente vascular cerebral

BSA – Albumina de soro bovino

CBB – Coomassie Brilliant Blue G-250

DCV – Doenças cardiovasculares

DDR – Dose diária recomendada

DGS – Direção-Geral da Saúde

DIC – Doença isquémica do coração

DPPH^{*} – Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

DR – Dose de referência

EAG – Equivalentes de ácido gálgico

EC – Equivalentes de catequina

EEC – Equivalentes de epicatequina

ET – Equivalentes em Trolox

EU – União Europeia

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

FIPA – Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares

GAE – Gallic acid equivalent

GEE – Gases com efeito de estufa

HACCP – Análise dos Perigos e Controlo dos Pontos Críticos

HPA – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

IAA – Indústria agroalimentar

INE – Instituto Nacional de Estatística

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade

LOD – Limite de deteção

OMS – Organização Mundial de Saúde

PNPAS – Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável

PTWI – Ingestão semanal aceitável provisória

RNS – Espécies reativas de nitrogénio

ROS – Espécies reativas de oxigénio

TFC – Teor de flavonoides totais

TPC – Teor de fenólicos totais

1. Introdução

1.1. Tema e objetivos

O tema do estágio é “Alimentos sustentáveis e funcionais para um coração saudável”, e teve como objetivo principal desenvolver alimentos funcionais a partir de diferentes matrizes vegetais de baixo custo, nativas e altamente disponíveis em Portugal.

Para a realização deste projeto desenvolveu-se um substituto de café, uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo, tendo sido selecionadas duas matrizes para a produção desta bebida: a bolota e a alfarroba. Ambas foram escolhidas com o propósito de valorizar recursos naturais abundantes em território nacional, ainda pouco explorados na alimentação humana, e por apresentarem um grande potencial na sua utilização no combate a diversas doenças cardiovasculares.

Para atingir o objetivo deste trabalho, realizou-se uma caracterização química e nutricional e efetuou-se uma avaliação da atividade antioxidante e da bioatividade tanto das matrizes como do produto alimentício funcional desenvolvido (bebidas), de modo a validar o produto como um substituto de café funcional e com propriedades cardioprotetoras. Por fim, realizou-se também uma análise sensorial às propriedades organolépticas das bebidas desenvolvidas.

1.2. Organização da dissertação

O presente trabalho encontra-se organizado em 5 capítulos. No primeiro capítulo, é feita uma breve introdução através da apresentação do tema e objetivos de estágio e descreve-se a organização do relatório.

O segundo capítulo encontra-se dividido em quatro subcapítulos onde são apresentados conceitos teóricos relativamente às doenças cardiovasculares, à indústria agroalimentar e processamento de alimentos, e por fim à composição e valor nutricional das matrizes (bolota e alfarroba), assim como o seu processamento e potenciais aplicações em produtos alimentares.

No terceiro capítulo são apresentados: as matrizes e a pré-preparação das mesmas; os reagentes/materiais usados; o processamento do produto final e análise sensorial prévia do mesmo; e os procedimentos experimentais efetuados para este trabalho. No quarto capítulo, são apresentados os resultados obtidos e realizada a interpretação dos mesmos e no quinto capítulo são sintetizadas as conclusões relativas ao trabalho realizado. No final do relatório encontram-se a Lista de Referências e os Anexos.

2. Fundamentos teóricos

2.1. Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte e invalidez a nível mundial, causando a morte a mais de 17 milhões de pessoas todos os anos, apresentando-se assim como um dos mais importantes problemas de saúde pública atualmente. As DCV são uma classe de doenças que afetam o sistema cardiovascular, ou seja, o coração e/ou vasos sanguíneos e incluem hipertensão, doenças coronárias, doenças cerebrovasculares, doenças cardíacas reumáticas e outras doenças (WHO, 2021).

A maioria das DCV são provocadas por aterosclerose, ou seja, pela acumulação de placas de gordura e cálcio no interior das artérias que dificultam ou impedem a circulação do sangue nos órgãos (Bourbon et al., 2016). Quando isto acontece, as artérias podem fechar e deixar de poder oxigenar os tecidos, encontrando-se obstruídas, o que causa a ocorrência de um enfarte na região que não recebeu oxigénio. Quando a aterosclerose se desenvolve nas artérias coronárias pode causar sintomas e doenças como a doença isquémica do coração (DIC), ou até provocar um enfarte do miocárdio. Por outro lado, quando o depósito destas placas acontece nas artérias do cérebro, pode originar sintomas como, por exemplo, alterações de memória, tonturas ou causar um acidente vascular cerebral (AVC) (Bourbon et al., 2016).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que 17,9 milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares em 2019, o que representa 32% de todas as mortes a nível mundial, sendo que destas mortes, 85% foram causadas por ataque cardíaco e AVC. Não só a mortalidade, mas também a incapacidade causada pela DCV permanece extremamente elevada e, por conseguinte, as DCV continuam a ser a principal causa somática de perda de esperança de vida saudável (Amini et al., 2021; Camp, 2014).

Desta forma, como se pode analisar pelo gráfico presente na Figura 1, o número de mortes por DCV está a crescer a nível mundial ao longo dos anos, passando de 14,2 milhões em 2000, para 15,9 milhões em 2010 e para 17,9 milhões em 2019 (Ulster University, 2021).

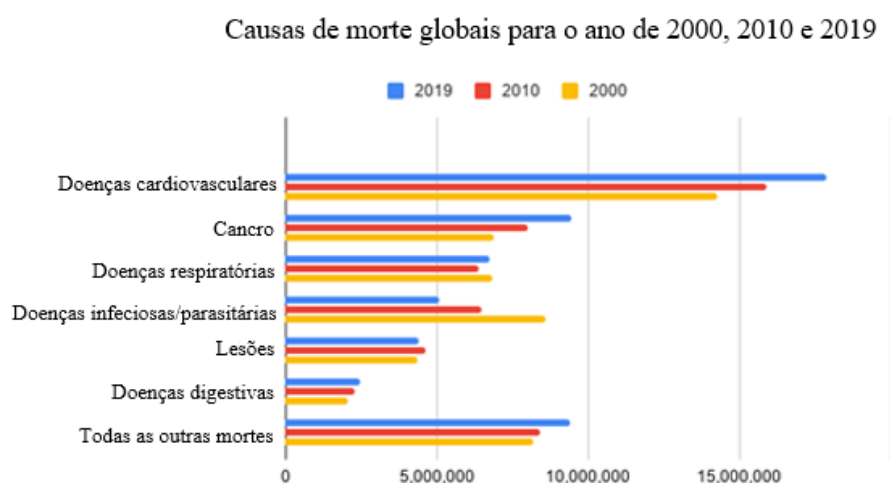


Figura 1. Principais causas de morte a nível mundial ao longo dos anos. Adaptado de (Ulster University, 2021).

De acordo com os dados de 2019 (Figura 1), as DCV são assim a principal causa de morte dentro das doenças não transmissíveis, contribuindo para quase um terço da mortalidade global (17,9 milhões), seguida do cancro (9,3 milhões), das doenças respiratórias (4,1 milhões) e da diabetes (1,5 milhões) (WHO, 2021). Entretanto, se a tendência atual se mantiver, e de acordo com as projeções da OMS, estima-se que o número total anual de mortes por DCV aumentará para mais de 23 milhões em 2030 em todo o mundo, continuando a ser a principal causa de morte (Mathers & Loncar, 2005).

Nas últimas décadas, embora a prevalência desta patologia esteja a diminuir em muitos países desenvolvidos, prevê-se que aumente nos países em desenvolvimento e segundo a OMS, mais de três quartos das mortes por DCV ocorreram em países de baixo e médio rendimento, o que constitui um problema epidémico crescente nos últimos anos (Amini et al., 2021).

Na generalidade, as DCV são progressivamente mais comuns com o avanço da idade, sendo que mais de quatro em cada cinco mortes por doenças cardiovasculares devem-se a ataques cardíacos e AVC e um terço destas mortes ocorrem prematuramente em pessoas com menos de 70 anos de idade (WHO, 2021).

Neste sentido, esta patologia continua a ser a principal causa de morte prematura na Europa, embora a mortalidade por DCV tenha diminuído consideravelmente ao longo das últimas décadas em muitos países europeus, incluindo os países da Europa Central e Oriental, que registaram aumentos consideráveis até ao início do século XXI (Wilkins et al., 2017). No entanto, todos os anos as DCV causam cerca de 3,9 milhões de mortes na Europa e mais de 1,8 milhões de mortes só na União Europeia (UE), tendo sido responsáveis por 45% de todas as mortes na Europa e 37% de todas as mortes na UE (Wilkins et al., 2017). Na Figura 2 é possível observar que as DCV, que abrangem a maioria das doenças relacionadas com o sistema circulatório, foram responsáveis por 36% das mortes que ocorreram no ano de 2016, na UE.

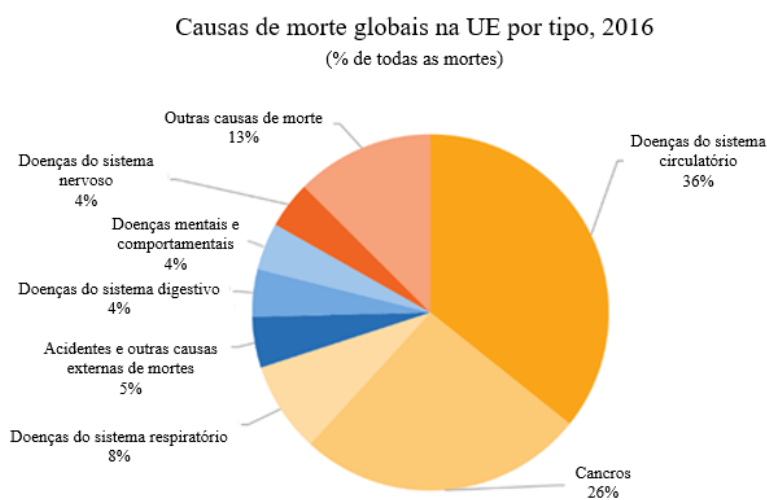


Figura 2. Principais causas de morte na UE em 2016. Adaptado de (Eurostat, 2019).

Em Portugal, as DCV, nomeadamente a doença isquémica do coração e os AVC, são a principal causa de mortalidade no país, tal como se verifica em muitos países ocidentais, sendo considerada, no entanto, das mais elevadas da Europa e do mundo. Estas doenças causam a morte a cerca de 35 mil portugueses por ano, representando um terço de toda a mortalidade no país, estando também entre as principais causas de morbilidade e invalidez (DGS, 2006).

Com base nos dados de 2012 fornecidos pelo Instituto Nacional de Estatística (INE), as mortes por DCV representaram cerca de 30,4% da mortalidade em Portugal, ligeiramente mais nas mulheres (34,7%) do que nos homens (26,3%), como representado na Figura 3 (Rocha & Nogueira, 2015).

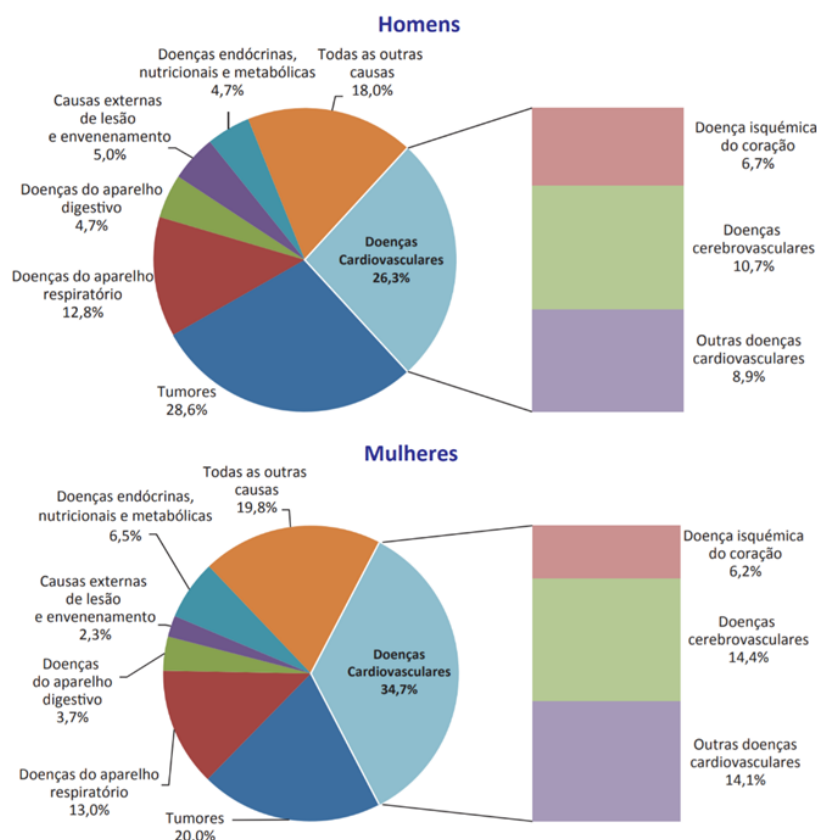


Figura 3. Percentagem das principais causas de morte, entre homens e mulheres, em Portugal no ano de 2012 (Rocha & Nogueira, 2015).

Contudo, verificou-se uma redução da taxa de mortalidade para estas doenças nos últimos 10 anos, que foi maior em Portugal do que nos outros países da região Mediterrânica. Neste sentido, dados mais recentes apresentados pelo INE revelaram que ocorreu uma diminuição da proporção de mortes causadas por DCV no total de mortes, de 31,9% em 2009 para 29,9% em 2019, principalmente devido à tendência para a diminuição de mortes por AVC (INE, 2021).

A presença de complicações cardiovasculares depende da associação entre as características individuais de cada indivíduo e os fatores de risco associados à patologia, cujos efeitos são sinérgicos e multiplicativos, amplificando o risco global cardiovascular. Com isto, a melhor forma de prevenir as DCV é controlar e diminuir os fatores de risco com a adoção de medidas preventivas a estilos de vida mais saudáveis (Sousa et al., 2010).

A prevenção contra o risco de DCV é muito semelhante ao das outras doenças não transmissíveis. A primeira abordagem passa pela alteração de fatores de risco comportamentais que são modificáveis, tais como dietas inadequadas, sedentarismo, uso de tabaco e uso nocivo do álcool. Os efeitos destes fatores de risco podem-se manifestar em indivíduos por meio de pressão arterial elevada (hipertensão arterial), níveis elevados de açúcar no sangue (diabetes), colesterol elevado (hipercolesterolemia), excesso de peso e obesidade, entre outros. Estes fatores de risco podem ser mensurados em unidades básicas de saúde e indicam um maior risco de desenvolvimento de ataques cardíacos, AVC, insuficiência cardíaca, entre outras complicações (Sousa et al., 2010).

A dieta representa o fator modificável mais importante para prevenir as DCV, sendo que há evidências de que os padrões alimentares baseados em produtos vegetais estão associados a um menor risco de ocorrência de problemas cardiovasculares, por possuírem nomeadamente efeitos anti-inflamatórios, anti-hipertensivos, hipolipidémicos e atividades hipoglicémicas. Desta forma, os hábitos alimentares são um importante fator que influencia o risco cardiovascular e cada vez mais tem aumentado o interesse nos padrões alimentares, dos quais a dieta mediterrânica é a mais estudada (Palma, 2020).

2.2. A indústria agroalimentar

O setor agroalimentar tem uma grande importância atualmente, não só pelo forte impacto que apresenta na economia nacional, europeia e mundial, mas também porque representa a forma de subsistência da humanidade, sendo considerado altamente competitivo, em desenvolvimento e com elevado impacto a nível económico. Este setor inclui o conjunto de atividades relacionadas com a transformação de matérias-primas em bens alimentares ou bebidas e a sua disponibilização ao consumidor final, abrangendo atividades como a agricultura, a silvicultura, a indústria alimentar e de bebidas e a distribuição (ENEI, 2013).

A indústria agroalimentar (IAA) assegura assim a transformação de alimentos e bebidas e assume uma relevância estratégica no contexto nacional pelos bens imprescindíveis que produz e pelo valor e emprego que gera. Segundo dados da Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares (FIPA) relativos ao ano de 2019, das indústrias transformadoras, a IAA é a que mais contribui para a economia nacional, tanto em volume de negócios (17 mil milhões de euros) como em valor acrescentado bruto (3,3 mil milhões de euros), representando 20% do total da indústria transformadora em Portugal (FIPA, 2019). A IAA é também a segunda indústria transformadora que mais emprega em Portugal, sendo constituída por cerca de 10 500 empresas, maioritariamente de pequena e média dimensão, contribuindo direta e indiretamente para um total de 16% do emprego nacional (Magalhães, 2012).

A nível europeu, a IAA é igualmente a maior indústria na UE, com um volume de negócios registados no ano de 2020 de 1,2 triliões de euros, gerando cerca de 4,82 milhões de empregos. A UE é também o maior exportador de produtos alimentares e bebidas do mundo, com exportações que atingem 120 mil milhões de euros e um excedente comercial de 44 mil milhões de euros (FoodDrinkEurope, 2020).

Além da vertente económica, atingir um desenvolvimento sustentável na IAA tornou-se uma prioridade neste setor, sendo essencial responder às necessidades das gerações atuais, sem comprometer o futuro das próximas. As mudanças climáticas, a limitação dos recursos fundamentais e o crescimento da população mundial torna essencial desenvolver e manter a capacidade dos sistemas agrícolas e de produção no fornecimento de alimentos (Pacheco, 2015). Ademais, as mudanças nos estilos de vida e uma maior sensibilização por parte dos consumidores para a proteção do ambiente e respeito pelos direitos humanos modificaram radicalmente as exigências da população, tornando a inovação em produtos sustentáveis progressivamente mais importante para as empresas agroalimentares (Aibar-Guzmán et al., 2022).

Por outro lado, a valorização de subprodutos derivados da IAA tem sido cada vez mais uma questão de extrema importância para o setor agroalimentar, pois existem diversas oportunidades para o desenvolvimento sustentado de novos produtos de valor acrescentado variável, sendo que as empresas

agroalimentares devem estar conscientes deste desafio e assumirem esta questão como determinante para o seu desenvolvimento (Pintado & Teixeira, 2015). Neste sentido, a IAA tem sido pioneira no lançamento de iniciativas sustentáveis que visam a permanente inovação e adequação dos produtos alimentares, uma melhor comunicação com os consumidores e, acima de tudo, a promoção de escolhas diversificadas e de uma alimentação saudável (FIPA, 2019).

2.2.1. Alimentos funcionais com efeitos cardioprotetores

Nos dias de hoje existe uma maior consciencialização por parte dos consumidores para a adoção de um estilo de vida saudável, sendo os consumidores cada vez mais exigentes com a sua alimentação e com os benefícios que cada alimento proporciona. Entre as principais preocupações com a saúde destacam-se as DCV, a obesidade, a diabetes, a hipertensão e o cancro (Oliveira & Cardoso, 2010).

Está comprovado que um estilo de vida saudável, associado a uma alimentação equilibrada, traz benefícios para a saúde humana, e por isso, os alimentos que proporcionam um estilo de vida mais saudável e que diminuam o risco de doenças, estão a desempenhar um papel cada vez mais importante na sociedade atual. Desta forma, os consumidores não se limitam a procurar apenas alimentos que os satisfaçam sensorialmente e que sejam uma fonte de nutrientes, mas também procuram aqueles que são vistos como formas de prevenir e reduzir o aparecimento de certas doenças, aumentando o seu bem-estar físico e mental (Oliveira & Cardoso, 2010).

Este aumento da consciência do consumidor em combinação com os avanços em diversos domínios científicos deu origem ao aparecimento de uma nova geração de produtos: os alimentos funcionais. Embora todos os alimentos forneçam nutrientes e energia, fundamentais para sustentar a vida, estes só podem ser considerados funcionais se proporcionarem além das suas funções nutricionais básicas, benefícios fisiológicos adicionais que contribuam para a redução do risco de doenças ou otimização da saúde do consumidor (Pereira, 2014). Os alimentos funcionais podem ser alimentos naturais ou processados que contêm constituintes específicos, que desempenham um papel particular nas funções fisiológicas do organismo humano (Oliveira & Cardoso, 2010).

Os benefícios dos alimentos funcionais estão relacionados com vários efeitos metabólicos e fisiológicos resultantes da interação de determinadas substâncias bioativas com o organismo humano. Desta forma, os alimentos funcionais contêm um ou mais compostos bioativos que podem ter alguns mecanismos de ação benéficos e cardioprotetores para a saúde, como atividade antioxidante, modulação da atividade de enzimas, diminuição da agregação plaquetária, alteração no metabolismo do colesterol, redução da pressão sanguínea, efeitos antibacterianos e antivirais, controlo da diabetes, efeitos anticancerígenos, entre outros (Figueiredo & Carvalho, 2015).

Com isto, os alimentos funcionais enquanto fonte de energia e nutrição podem ter efeitos positivos adicionais nas funções fisiológicas do organismo, como no sistema cardiovascular e, assim, produzir benefícios para a prevenção das DCV. De entre os alimentos funcionais com efeitos cardioprotetores, destacam-se os que apresentam na sua constituição compostos bioativos, tais como os compostos fenólicos, os carotenoides, os ácidos gordos polinsaturados, as vitaminas E e C e as fibras alimentares (Hofmann et al., 2018).

Na Tabela 1 apresentam-se alguns dos principais compostos bioativos presentes em alimentos funcionais de origem vegetal e alguns dos seus respetivos benefícios funcionais e potenciais efeitos cardioprotetores para a saúde.

Tabela 1. Principais compostos bioativos presentes em alguns alimentos funcionais e os seus respetivos benefícios (Pereira, 2014, Hofmann et al., 2018; Moreira, 2012)

Alimentos funcionais	Compostos bioativos	Benefícios funcionais e cardioprotetores
Legumes e verduras, frutas, soja e chocolate preto	Compostos fenólicos (polifenóis, flavonoides incluindo catequinas, etc.)	<ul style="list-style-type: none"> • Atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena, antibacteriana e antiviral; • Redução do colesterol sanguíneo e da pressão arterial
Frutos secos, sementes e óleos vegetais	Ácidos gordos polinsaturados	<ul style="list-style-type: none"> • Redução do colesterol sanguíneo (essencialmente triglicerídeos no sangue); • Atividade anti-inflamatória; • Redução da pressão arterial
Vegetais e frutas	Carotenoides	<ul style="list-style-type: none"> • Atividade antioxidante • Redução do colesterol sanguíneo (previne a oxidação do colesterol LDL^a);
Nozes, sementes e óleos vegetais	Vitamina E	<ul style="list-style-type: none"> • Atividade antioxidante e anti-inflamatória • Redução do colesterol sanguíneo
Frutas, citrinos e vegetais	Vitamina C	<ul style="list-style-type: none"> • Redução do colesterol sanguíneo e da pressão arterial • Controlo de peso
Vegetais, frutas, frutos secos e grãos integrais	Fibras alimentares	<ul style="list-style-type: none"> • Redução do colesterol sanguíneo e da pressão arterial • Controlo de peso

^aLDL - Lipoproteínas de baixa densidade

Os compostos fenólicos representam um vasto grupo de fitoquímicos e são os principais componentes antioxidantes presentes nos vegetais, pelo que ostentam a capacidade de proteção contra DCV, cancro e doenças neurodegenerativas, aumentam a atividade anti-inflamatória e otimizam o sistema imunitário. Dois dos maiores grupos de compostos fenólicos são os flavonoides e os taninos, amplamente encontrados em alimentos de origem vegetal, estando presentes em quantidades significativas em frutas, verduras e legumes (Pereira, 2014; Figueiredo & Carvalho, 2015)

Os principais ácidos gordos polinsaturados presentes em alimentos funcionais são os ómega-3 e os ómega-6 e encontram-se disponíveis sobretudo em sementes e frutos secos (ex. sementes de girassol e nozes), mas também em óleos e margarinas vegetais. Relacionam-se com a redução do risco de DCV, sendo que estudos indicam que os ácidos gordos ómega-3 reduzem o colesterol, auxiliando na manutenção de níveis saudáveis de triglicéridos, tem ação anti-inflamatória e diminuem a hipertensão arterial. Quanto aos ómega-6, estes apresentam essencialmente ação anti-inflamatória e associam-se à estrutura das membranas celulares influenciando a permeabilidade dos vasos, a viscosidade sanguínea e a pressão arterial (Pereira, 2014).

Os carotenoides, a vitamina E e a vitamina C são exemplos de compostos antioxidantes presentes em diversos alimentos funcionais, que têm como principal papel a prevenção ou redução da oxidação nos sistemas biológicos por ação dos radicais livres (Pereira, 2014).

Os carotenoides encontram-se em alimentos de cor vermelha, laranja ou amarela, presentes nomeadamente em frutas (ex. laranja e pêsego) e vegetais (ex. tomate e abóbora). Os carotenos, principalmente o β -caroteno e o licopeno são os principais carotenoides que têm ação antioxidante, promovendo proteção contra cancro e DCV, apresentando também capacidade de inibir a aterosclerose, reduzindo os níveis de colesterol LDL no sangue (Pereira, 2014; Figueiredo & Carvalho, 2015)

A vitamina E e C são fortes antioxidantes que inibem danos oxidativos, constituindo um dos principais mecanismos de defesa endógena do organismo. A vitamina E exerce um elevado efeito antioxidante, pois pode atuar diretamente na neutralização dos radicais livres ou participar indiretamente nos sistemas enzimáticos e está comumente presente em óleos vegetais, nozes e sementes. O seu consumo em alimentos funcionais reduz o risco de DCV, fortalece o sistema imunitário e minimiza os danos provocados pelos radicais livres em doenças como cancro e artrite (Moreira, 2012).

Por outro lado, a vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico, está presente em diversas frutas (ex. limão e laranja) e hortícolas (ex. brócolos e pimento). Contribui essencialmente para a proteção do desenvolvimento de tumores e de danos causados pela exposição à radiação e a medicamentos, podendo também auxiliar na diminuição do colesterol (Pereira, 2014).

As fibras são um grupo de componentes alimentares conhecidos por melhorar o funcionamento do sistema gastrointestinal, porém muitos estudos têm vindo a mostrar que dietas ricas em fibras podem também prevenir o aparecimento de DCV, reduzindo principalmente o risco de doenças coronárias, AVC, diabetes e obesidade (Schieber et al., 2001). Assim, as fibras alimentares auxiliam no controlo de peso e consequentemente no tratamento da obesidade, pois diminuem o teor de energia metabolizável da dieta, reduzem também a pressão arterial e inibem a absorção de gordura, reduzindo os níveis de colesterol. Estão integradas essencialmente em alimentos funcionais como vegetais (ex. milho, e feijão), frutas (ex. banana e abacate), frutos secos (ex. linhaça e amêndoas) e grãos integrais (ex. aveia e granola) (Figueiredo & Carvalho, 2015).

Em suma, os alimentos funcionais quando consumidos em quantidades adequadas, podem ajudar na redução do risco de DCV por vários mecanismos. Desta forma, o desenvolvimento de novos produtos alimentares funcionais de origem vegetal com efeitos cardioprotetores, que apresentem benefícios adicionais para a saúde, tem sido uma das áreas de maior potencial de crescimento na IAA (Oliveira & Cardoso, 2010).

2.2.2. Processamento de alimentos

Historicamente, o processamento de alimentos tem desempenhado um papel fundamental em cada etapa do sistema alimentar, desde a produção até ao consumo. Em tempos, tinha essencialmente como objetivo aumentar a satisfação das necessidades do consumidor sobretudo através do prolongamento da vida útil dos produtos, assim como melhorar as suas características organolépticas, sendo que eram utilizadas práticas simples de conservação de alimentos, tais como adição de sal, fumagem e fermentação. Atualmente, graças aos métodos modernos de processamento baseados em conhecimentos e tecnologia adquiridos ao longo dos anos, a indústria alimentar é capaz de oferecer aos consumidores não só produtos de qualidade, mas também garantir a segurança alimentar, preservar e acrescentar valor nutricional e melhorar o aspeto final do produto, assim como diminuir o tempo de preparação dos alimentos para consumo (Cannon & Flores, 2014; Ribeiro et al., 2017).

O processamento alimentar consiste assim em qualquer procedimento de alteração intencional ou preservação do alimento no seu estado *in natura*, a nível físico, biológico e/ou químico. Desta forma, existem diversas técnicas de processamento e de preservação para que os alimentos cumpram um certo padrão de qualidade, sendo as mais comuns os processamentos térmicos, como o processamento por aplicação de calor (Crittenden & Schnorr, 2017).

Podem englobar-se no processamento térmico de alimentos todos os procedimentos que entre outros objetivos visam a redução ou destruição dos microrganismos pelo calor, como a pasteurização e a esterilização, cuja principal finalidade é a destruição da flora microbiana. Mas também o são o branqueamento, a evaporação, destilação, desidratação, torra, cozedura, fritura de alimentos, entre outros (Brennan, 2006). No entanto, existem outros tipos de processamento que incluem a preservação dos alimentos pelo frio, como o resfriamento e o congelamento, assim como outros processos como por exemplo a fermentação, a adição de substâncias químicas e a moagem (Ribeiro et al., 2017).

Neste trabalho vão ser estudados diferentes processamentos, como a moagem, a desidratação e a torra de matrizes vegetais, que serão discutidos mais detalhadamente.

A moagem consiste na redução do tamanho de alimentos sólidos, desempenhando um papel importante em muitos aspetos na indústria alimentar uma vez que aumenta a superfície do material sólido, o que facilita e aumenta a eficácia de posteriores processos como a secagem, a extração e a homogeneização (Jung & Yoon, 2018). A moagem é um processo frequentemente utilizado em grãos, para reduzi-los a farinha ou pó.

A desidratação, também conhecida como secagem, consiste na aplicação de calor sob condições controladas, para remover por evaporação, a maior parte da água presente num alimento. Assim, o objetivo principal da desidratação é prolongar a vida útil dos alimentos, sem necessidade de ter um armazenamento refrigerado, por meio da redução da humidade disponível no alimento, o que inibe o crescimento e o desenvolvimento de deterioração e dos microrganismos patogénicos, reduzindo a atividade enzimática e o ritmo a que ocorrem as alterações químicas indesejáveis (Brennan, 2006; OPAS, 2019). Alguns alimentos comercialmente desidratados são o café, as massas, o cacau, o leite, farinhas, cogumelos e frutas (OPAS, 2019).

Por outro lado, a torra é uma técnica de processamento alimentar que utiliza uma fonte de calor adequada para cozinhar um alimento uniformemente e melhorar a digestibilidade, paladar e aspetos sensoriais com modificações estruturais desejáveis da matriz alimentar. Este processo é usado tanto na fabricação de café, de cacau e de cerveja, como também na torra de frutos secos como nozes, amêndoas, avelãs, entre outros (Sruthi et al., 2021).

2.2.2.1. Vantagens e Desvantagens do Processamento

O processamento de alimentos induz mudanças e interações entre os constituintes dos alimentos, podendo ter um impacto positivo, como a destruição de inibidores ou a formação de complexos desejáveis entre os componentes dos alimentos, ou um impacto negativo, pois pode levar à formação de compostos indesejáveis e à perda de nutrientes presentes no alimento (Correia et al., 2008).

Com isto, as vantagens mais importantes do processamento de alimentos podem ser sumarizadas como se segue:

- **Aumento da segurança alimentar** – o principal benefício do processamento alimentar é a destruição de compostos e microrganismos indesejáveis, através da eliminação de agentes patogénicos como vírus, bactérias e parasitas, assim como a inativação de toxinas e enzimas naturais. Por exemplo, no caso do processo de esterilização dos alimentos enlatados, assim como o de pasteurização do leite, levando à destruição de microrganismos patogénicos (Correia et al., 2008; Van Boekel et al., 2010).
- **Prolongamento da vida útil dos alimentos** – aumenta o prazo de validade dos alimentos, conservando-os durante mais tempo (ex. alimentos perecíveis como frutas, carnes e leite) (Van Boekel et al., 2010).
- **Aumento do valor nutritivo** – pode melhorar a digestibilidade, biodisponibilidade dos nutrientes e acrescentar valor nutricional e propriedades funcionais aos alimentos (Van Boekel et al., 2010). Como por exemplo, no caso do processamento térmico do tomate, a absorção de licopeno é maior em produtos que utilizam tomates cozidos (ex. polpa de tomate) comparativamente ao tomate cru.
- **Aumento da qualidade sensorial** – confere aos produtos finais características sensoriais desejáveis, como alteração do paladar, textura e sabor (ex. panificação do pão e torra do grão de café) (Van Boekel et al., 2010).
- **Permite consumir uma maior diversidade de alimentos** – aumenta a variedade de produtos alimentares disponíveis, uma vez que se pode conservar, embalar e transportar alimentos em segurança, e também não causa restrições ao que é produzido localmente nem à sazonalidade, alargando a disponibilidade e acessibilidade dos alimentos (Van Boekel et al., 2010).
- **Conveniência** – aumenta a disponibilidade de alimentos prontos a consumir e semi-preparados (ex. refeições congeladas de micro-ondas) (Van Boekel et al., 2010).
- **Melhoria da qualidade de vida dos consumidores** – é necessário menos tempo para o fornecimento e preparação dos alimentos (Van Boekel et al., 2010).

Contudo, o processamento pode também prejudicar a qualidade dos alimentos, levando a desvantagens, como por exemplo:

- **Perdas de nutrientes essenciais** – pode haver reações químicas que levam à perda de nutrientes (ex. o cozimento de vegetais em água e a altas temperaturas reduz o conteúdo de vitamina C e de minerais) (Van Boekel et al., 2010).
- **Formação de compostos indesejáveis** – pode conduzir a alterações indesejáveis nos alimentos sob a forma de redução do valor nutricional, por exemplo devido à diminuição da

biodisponibilidade ou pela formação de novas substâncias, como por exemplo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), acrilamida, furano ou acroleína, entre outros (Van Boekel et al., 2010; Henriques, 2015).

- **Perda de características organolépticas** – em alguns casos o alimento pode perder, por exemplo o sabor, a textura, o aroma ou a cor (ex. desidratação de alimentos) (Van Boekel et al., 2010).

Tendo em vista os diversos aspetos benéficos que o processamento dos alimentos pode trazer, como tornar o alimento mais seguro microbiologicamente e mais rico nutricionalmente, é necessário ter em conta que essa transformação pode também prejudicar a qualidade dos alimentos, levando a consequências indesejáveis. Desta forma, ao estabelecer a severidade de um processamento alimentar é essencial controlar os parâmetros de cada processo para que o alimento não perca as suas características sensoriais e nutricionais em paralelo à mitigação da formação de contaminantes (Lemos et al., 2020). Logo, é importante considerar os objetivos específicos que se pretendem alcançar no produto final e procurar tratamentos que não superem o necessário para garantir segurança e longevidade aceitáveis, devendo fazer-se uma abordagem integrada que também contemple os efeitos positivos que o processamento pode trazer ao produto.

2.2.3. Segurança e higiene alimentar

A segurança e higiene alimentar é uma área que envolve um conjunto de normas de manipulação de alimentos, incluindo a produção, o transporte, o armazenamento e a distribuição, cujo objetivo é garantir que os alimentos não representem riscos para a saúde humana e deste modo prevenir doenças de origem alimentar.

A contaminação microbiológica e química dos alimentos é uma das principais causas de doenças do foro alimentar. As patologias associadas a estas contaminações continuam a ser um problema real e muitas vezes difícil de evitar em todos os países, quer pelas consequências que podem trazer para as pessoas afetadas, causando sequelas graves ou até morte, quer pelas consequências económicas significativas para as empresas (Babista & Saraiva, 2003). Estima-se que até um terço da população dos países desenvolvidos é afetada anualmente por doenças de origem alimentar, sendo provável que o problema seja ainda mais generalizado nos países em desenvolvimento (WHO & FAO, 2006).

Em termos de segurança alimentar, as fontes de contaminação mais frequentes na origem de surtos de doenças alimentares são essencialmente ingredientes contaminados, más condições de higiene, falha nos processos de controlo, processamento inadequado dos alimentos e contaminação cruzada. Neste sentido, as doenças alimentares podem surgir de diversas formas, habitualmente por doenças infecciosas ou intoxicações alimentares. As primeiras são geralmente causadas pela ingestão de alimentos contaminados por bactérias patogénicas, enquanto as intoxicações alimentares podem ter origem bacteriana, química ou por contaminação com toxinas de origem natural existentes nos alimentos (Bruno, 2017).

No contexto dos perigos alimentares, a degradação dos alimentos ocorre de forma natural por ação de microrganismos que utilizam os alimentos como fonte de nutrientes, tornando-os impróprios para consumo, mas para além dos perigos para a segurança alimentar de natureza biológica, existem também perigos de natureza química, física e nutricional (ASAE, 2009). Na Tabela 2 estão

representados os tipos de perigos e alguns exemplos, assim como alguns dos alimentos associados e potenciais doenças provocadas no consumidor.

Tabela 2. Perigos de origem alimentar e respetivos exemplos de alimentos e potenciais doenças associados (ASAE, 2009).

Tipos de perigos	Exemplos de perigos	Exemplos de alimentos associados	Potencias doenças
Biológicos			
Bactérias	<i>Salmonella sp.</i>	Ovos, aves, leite cru e derivados	Salmonelose
	<i>Campylobacter jejuni</i>	Leite cru, queijos, gelados e saladas	Campilobacteriose
Vírus	Vírus da Hepatite A	Peixe, marisco, vegetais, água, frutos e leite	Hepatite A
Parasitas	<i>Toxoplasma</i>	Carne de porco e borrego	Toxoplasmose
	<i>Giardia</i>	Saladas e água	Giardose
Químicos			
Contaminantes de origem biológica: Toxinas naturais	Aflatoxinas	Frutos secos, milho, leite e derivados	<ul style="list-style-type: none"> • Cancro • Alterações do sistema imunitário • Doenças degenerativas do sistema nervoso • Disfunção ao nível de diversos órgãos • Partos prematuros
	Solanina	Batata	
	Toxinas marinhas	Bivalves e marisco	
Poluentes de origem industrial	Mercúrio, cádmio e chumbo	Peixe	
	Dioxinas	Peixe e gorduras animais	
Contaminantes resultantes do processamento alimentar	Acrilamida	Batatas fritas, café e pão	
	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA)	Fumados, óleos vegetais e grelhados	
Nutricionais			
Sal, gorduras e açúcar em excesso		Alimentos com excesso de sal (ex. snacks)	DCV, obesidade e diabetes
Alergénios		Leite de vaca, amendoins, ovos e crustáceos	Alergias
Físicos			
Ossos, espinhas, vidros e metais		Todo o tipo de alimentos processados	Lesões físicas

Deste modo, garantir a segurança alimentar para proteger a saúde pública e promover o desenvolvimento económico continua a ser um desafio imprescindível, tanto nos países em desenvolvimento como nos desenvolvidos. No entanto, durante as últimas décadas foram alcançados progressos consideráveis para reforçar os sistemas de segurança alimentar em muitos países, salientando as oportunidades de reduzir e prevenir as doenças de origem alimentar (WHO & FAO, 2006).

A FAO e a OMS, em 1963, estabeleceram em conjunto a comissão do *Codex Alimentarius*, que têm como objetivo proteger a saúde dos consumidores e assegurar práticas justas relativamente ao comércio de alimentos. A *Codex Alimentarius* é uma autoridade de referência mundial que desenvolve normas alimentares, regulamentos e códigos de práticas, sendo que esta compilação define segurança alimentar como a garantia de que o alimento não causará danos ao consumidor, quando preparado e/ou consumido de acordo com o uso a que se destina e define também a higiene dos alimentos como todas as condições e medidas necessárias para garantir a segurança e a adequação dos alimentos em todas as etapas da cadeia de processamento (Codex Alimentarius, 2016).

Posteriormente, de forma a aumentar e harmonizar as medidas de controlo da segurança alimentar a nível internacional, a *Codex Alimentarius* publicou em 1993 o sistema de Análise dos Perigos e Controlo dos Pontos Críticos (HACCP), que provém do inglês “*Hazard Analysis and Critical Control Points*”. Este é um sistema preventivo de controlo da segurança alimentar que permite identificar, avaliar e controlar os perigos que são significativos para a segurança do alimento e quais as medidas preventivas necessárias para o seu controlo em todas as etapas de produção, baseando-se numa abordagem sistemática, documentada e verificável, direcionada a perigos microbiológicos, químicos e físicos (IPL, 2014)

Em Portugal, no seguimento do Decreto-Lei nº 237/2005, surge a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), com a missão de garantir aos consumidores o cumprimento das regras gerais de segurança e higiene aplicáveis aos géneros alimentícios, respondendo igualmente às necessidades de avaliação e comunicação do risco na cadeia alimentar e estabelecendo ligação com os outros países da UE (Guilherme, 2006). Em 2012 foi aprovado o primeiro programa nacional de alimentação, o Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável (PNPAS) desenvolvido pela Direção-Geral da Saúde (DGS), cujo objetivo foi implementar diversas medidas de forma a garantir a segurança alimentar da população portuguesa (Gregório et al., 2019)

Por fim, é importante salientar que para garantir um consumo seguro dos alimentos é preciso ter especial atenção aos valores limite de consumo para os aditivos e os contaminantes químicos, sendo que os níveis de ingestão diária aceitável (ADI) e de ingestão semanal aceitável provisória (PTWI) são expressos pela quantidade em miligramas da substância química que pode ser consumida pelo Homem, sem prejuízo para a saúde, por quilograma de peso corporal do consumidor (Henriques, 2015).

2.2.4. Valorização de subprodutos agroalimentares

O desperdício alimentar e a perda de alimentos constituem um enorme problema a nível mundial, com consequências graves em termos sociais, económicos e ambientais. Segundo um estudo divulgado pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), atualmente cerca de 1/3 dos alimentos produzidos anualmente para consumo humano são perdidos ou desperdiçados a nível mundial (como resíduo de processamento ou perda na cadeia), correspondendo a uma produção mundial de resíduos alimentares de cerca de 1,3 biliões de toneladas de alimentos por ano (FAO, 2019).

O aumento da quantidade destes resíduos que são gerados anualmente representa, não só uma oportunidade perdida para a economia e a segurança alimentar, mas também um desperdício de recursos naturais, como o solo, água e energia, e contribui indiretamente para a poluição ambiental, devido ao uso de fertilizantes e pesticidas e às emissões de gases com efeito de estufa (GEE), emitidos

durante a produção primária (por exemplo, produção animal) ou durante a valorização ou eliminação (compostagem, aterro) (CCDR-N, 2020).

Uma grande quantidade destes resíduos, também designados por subprodutos, são gerados pelo setor agroindustrial e são constituídos maioritariamente por sementes, cascas, folhas e matérias-primas com características indesejáveis (SPBT, 2015).

Com isto, mesmo que o excesso de alimentos comestíveis seja redistribuído com o máximo de eficácia, continuará a existir um elevado volume de subprodutos alimentares que não são normalmente comestíveis (por ex. cascas e sementes), sendo que uma parte desses resíduos são reaproveitados pelas vias tradicionais para a alimentação direta de animais ou para a compostagem. Outra parte significativa do desperdício alimentar são os alimentos que nunca chegam ao consumidor final pelo seu caráter altamente perecível. No entanto, estes subprodutos alimentares que são normalmente desvalorizados, contêm importantes teores de nutrientes e de compostos bioativos, potenciando uma enorme oportunidade de valorização desses resíduos para a alimentação humana (CCDR-N, 2020).

Os consumidores estão cada vez mais conscientes dos problemas de saúde relacionados com a sua dieta, exigindo por isso produtos naturais que esperam que sejam seguros e promotores de saúde (Schieber et al., 2001). Desta forma, a temática da economia circular tem vindo a ser aplicada de forma crescente no setor agroalimentar e, portanto, a valorização de resíduos e subprodutos agroalimentares apresenta-se hoje em dia, não só como uma necessidade, mas como uma oportunidade para obtenção de novos produtos de valor acrescentado e com grande impacto na economia das IAA, constituindo uma excelente oportunidade de negócio (Pintado & Teixeira, 2015).

A crescente preocupação do consumidor na manutenção de um estilo de vida saudável tem levado também ao aumento do consumo de produtos de origem vegetal. Os subprodutos do processamento de alimentos vegetais representam um grande problema de eliminação para a IAA, mas são também fontes promissoras de compostos que podem ser utilizados devido às suas propriedades nutricionais favoráveis (Schieber et al., 2001).

Os subprodutos agroalimentares, dependendo da sua origem, podem conter vários níveis de nutrientes básicos como proteínas, lípidos, minerais e hidratos de carbono (açúcares e fibras), podendo ainda incluir compostos funcionais de elevado valor diferenciado, como por exemplo, vitaminas (A e E), carotenoides, compostos fenólicos, entre outros. No entanto, tem sido dada especial atenção à fibra e aos compostos fenólicos dada a sua abundância nos subprodutos agroalimentares e, em geral, às propriedades biológicas a eles associados (Pintado & Teixeira, 2015).

Diversos estudos efetuados sobre a valorização de subprodutos agroalimentares têm contemplado a obtenção de inúmeros compostos nutricionais que são aplicados na IAA em alimentos funcionais, que trazem benefícios para a saúde humana ao mesmo tempo que previnem e ajudam no combate a diversas doenças, nomeadamente as DCV (Pintado & Teixeira, 2015).

Neste contexto, são vários os estudos atuais que investigam a obtenção de múltiplos ingredientes benéficos a partir de subprodutos, por exemplo: a partir de subprodutos de cereais (ex. farelo de arroz) com obtenção essencialmente de fibras, hemiceluloses, β -glucanas e oligossacarídeos pré-bióticos; a partir de raízes e tubérculos (ex. resíduos de cana-de-açúcar e mandioca), com obtenção principal de polifenóis e ácidos orgânicos; a partir de culturas oleaginosas (ex. soja e bagaço de azeitona) com obtenção de fitoesteróis, polifenóis e pectinas; e por fim a partir de frutos e vegetais (ex. cascas de frutos e bagaço de tomate) com obtenção principal de pectinas, fibras, carotenoides e polifenóis (Galanakis, 2012; Pintado & Teixeira 2015).

Em Portugal, os principais subprodutos estão relacionados com os principais setores agroindustriais, destacando-se os subprodutos do vinho, azeitona, indústria cervejeira, arroz, alfarroba, indústrias de processamento de vegetais e frutos. Atualmente, estes subprodutos são muito pouco valorizados, sendo que grande parte são direcionados para inceneração ou aterro, causando efeitos negativos sobre o ambiente, e apenas uma pequena percentagem para o desenvolvimento de fertilizantes ou alimentação animal (SPBT, 2015).

Por outro lado, estima-se que a população mundial atinja quase 10 mil milhões em 2050, obrigando a uma adaptação sustentável do sistema alimentar atual. Esta adaptação deverá incluir a minimização das perdas e desperdícios alimentares e o aproveitamento máximo dos recursos naturais que sustentam o sistema alimentar. Com isto, aumentar o consumo de alimentos que são muitas vezes desvalorizados e os seus subprodutos, de forma que estas novas alternativas consigam dar resposta à escassez de determinados tipos de alimentos, tem vindo a tornar-se cada vez mais uma prioridade inequívoca para as entidades governamentais e para a indústria agroalimentar (FAO, 2019).

Esta linha de pensamento tem como propósito garantir que toda a população tenha acesso a alimentos seguros e nutritivos, que sejam produzidos de forma sustentável e com claros benefícios nutricionais e ecológicos, enquanto satisfaçam as preferências alimentares dos consumidores, promovendo uma vida ativa e saudável. Contudo, existe uma grande parte de recursos alimentares que continuam a ser pouco explorados, pelo que o seu aproveitamento merece especial atenção, particularmente no que diz respeito matrizes vegetais de baixo custo e altamente disponíveis em Portugal (Vinha et al., 2016a). Um exemplo notável de tais matrizes naturais são a bolota e a alfarroba, que irão ser analisadas em detalhe nas próximas seções.

2.3. A Bolota

A bolota é um fruto seco proveniente de árvores de espécies do género *Quercus*, pertencente à família *Fagaceae*, um importante grupo de árvores de folha caduca ou persistente, predominante em climas temperados e tropicais. Esta família, à qual pertencem inúmeras espécies nativas da floresta portuguesa, é composta por 450 espécies a nível mundial, as quais diferem geralmente pela sua dinâmica de floração e frutificação e pelo índice de maturação que apresentam (Pacheco, 2015; Vinha et al., 2016b). Este é um fruto considerado indeiscente, ou seja, não se abre após o amadurecimento, e a queda dá-se normalmente no outono, quando as temperaturas começam a baixar (Díaz-Fernández et al., 2004).

Num sentido convencional, as bolotas sempre desempenharam um papel importante na economia rural, pois a grande maioria é utilizada na alimentação animal (particularmente para suínos em regime de pastoreio) e ainda hoje fazem parte da gastronomia tradicional de vários países mediterrâneos, sendo consumida na forma de farinha para fazer pão de bolota, ou até várias bebidas tradicionais como substituto de café ou licor de bolota (Cruz, 2018). No entanto, o seu valor nutricional e o seu elevado conteúdo fitoquímico têm suscitado o interesse de muitos investigadores que procuram alimentos subutilizados para integrar na dieta humana, trazendo potenciais efeitos benéficos para a saúde e para o tratamento de doenças (Vinha et al., 2016b)

Em Portugal existem mais de 300 espécies do género *Quercus*, sendo as mais comuns o carvalho-alvarinho (*Quercus robur* L.), carvalho-cerquinho (*Quercus faginea* Lam.), carvalho-negral (*Quercus pyrenaica* Willd.), a azinheira (*Quercus ilex* L.) e o sobreiro (*Quercus suber* L.) (Cruz, 2018;

Ezequiel, 2021). Na Figura 4 encontra-se representado a distribuição das zonas de predominância destas espécies no território nacional.

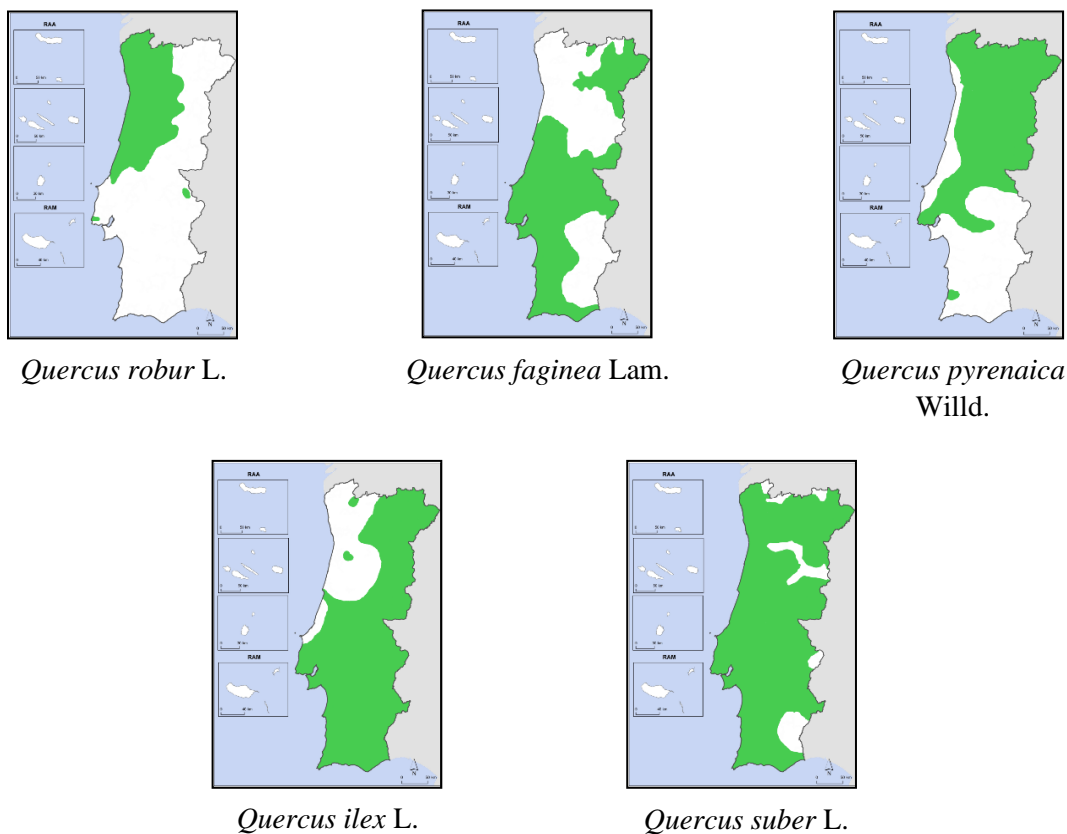


Figura 4. Representação da distribuição das espécies *Quercus* mais comuns identificadas em Portugal (a verde nos mapas) Adaptado de (Tiago, 2019).

As espécies do género *Quercus* ocupam uma área vegetal representativa, a nível nacional, de aproximadamente 1 200 000 ha, dos quais cerca de 80% estão concentrados no Alentejo. Embora o seu potencial como recurso alimentar natural ainda seja subestimado devido aos seus frutos apresentarem baixos índices de consumo na alimentação humana comparativamente a outros frutos secos, a sua ocupação territorial é significativamente maior do que a dedicada por exemplo ao cultivo de castanha (*Castanea sativa* Mill.) que ocupa cerca de 12 500 ha e à amêndoa (*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb) que ocupa perto de 36 530 ha (Cruz, 2018).

Para além da sua associação com fatores fisiológicos, na tentativa de correlacionar características tais como forma, tamanho, e teor de humidade com fatores ecológicos como clima e tipo de vegetação, as bolotas também foram estudadas pelo seu perfil nutricional e conteúdo fitoquímico, revelando grande variabilidade entre espécies e por vezes até dentro da mesma espécie (Vinha et al., 2016b).

Posto isto, pela sua importância nacional e internacional, a bolota é um dos recursos alimentares naturais mais promissores a ter em conta. Além de estar disponível em grande abundância em território português, contém diversos benefícios nutricionais associados e apresenta potenciais propriedades de prevenção de doenças, bem como a sua valorização também constitui um importante fator de sustentabilidade (Vinha et al., 2016a).

2.3.1. Composição e valor nutricional

A bolota é classificada como uma noz de uma só semente, possui uma forma ovoide e apresenta uma cúpula no topo, que liga a noz ao pedúnculo da árvore que tem como objetivo diferenciar as diferentes espécies. A noz é composta pelo pericarpo (casca) que é a capa externa lignificada que protege a semente, e pela semente que é constituída pela testa, uma espécie de membrana aveludada que reveste a semente, e o embrião onde se acumulam as reservas energéticas. Por sua vez, o embrião é constituído por dois cotilédones alargados que acumulam as grandes reservas e, no extremo oposto do pedúnculo, na base, o eixo embrionário, onde se localizam a gémula e a radícula, por onde se desenvolverá a futura planta (Bento, 2020).

Na Figura 5 encontra-se a constituição morfológica deste fruto, sendo possível distinguir os diferentes constituintes da bolota.

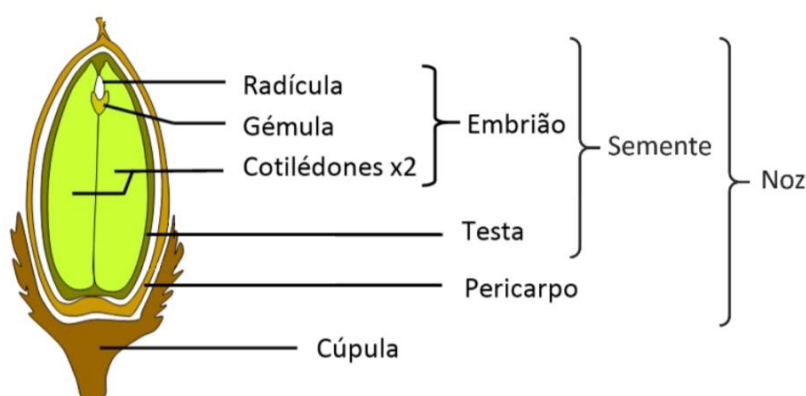


Figura 5. Constituição morfológica da bolota (Bento, 2020).

Do ponto de vista nutricional, a bolota é um alimento interessante e pode ser considerada como um alimento saudável, pois contém um elevado teor em hidratos de carbono (essencialmente amido), fibra, lípidos (nomeadamente ácidos gordos insaturados), proteínas, vitaminas (principalmente A e E), minerais e baixo teor de gordura, apresentando assim um elevado valor nutricional, comparável ao dos cereais mais comuns. Trata-se assim de uma fonte natural não só com um alto valor nutricional, mas também rica em compostos bioativos, para além de economicamente rentável (Vinha et al., 2016a).

No entanto, devido à alta variabilidade do género e dependendo da espécie, as bolotas podem diferir na sua composição química (Pacheco, 2015). Na Tabela 3 apresentam-se alguns valores, em base seca, retirados de estudos que foram efetuados sobre a composição química e a caracterização nutricional deste fruto.

Tabela 3. Composição química e valor nutricional da bolota (Silva et al. 2016; Szablowska, 2021; Vinha et al, 2016c).

Composição da bolota		
Água (%)	5,40 – 22,05	
Hidratos de carbono (%)	75 – 84	
Amido (%)	51 – 57	
Proteínas totais (%)	4,18 – 5,00	
Lípidos totais (%)	8,44 – 13,41	
Taninos totais (%)	3,48 – 10,9	
Principais ácidos gordos (% de todos os ácidos gordos)	Ácido oleico	59,85 – 60,92
	Ácido linoleico	15,34 – 15,91
	Ácido palmítico	14,09 – 14,98
Fibra (%)	10,89 – 17,9	
Cinzas (%)	1,81 – 2,04	
Principais componentes minerais (mg / 100g)	Potássio	379
	Cálcio	164
	Magnésio	54,2
	Ferro	18,61
	Manganês	3,65
	Cobre	1,04
	Zinco	0,83

Nota: Os valores tabelados correspondem às espécies *Quercus ilex*, *Quercus rotundifolia* e *Quercus robur*.

Os hidratos de carbono representam o principal componente nutritivo da bolota, onde se destaca o amido como composto maioritário (48% a 50%) e, em menores concentrações, açúcares solúveis como a sacarose e a glucose, assumindo assim os hidratos de carbono como a principal reserva de energia do fruto. Para além de energia, o elevado teor de amido presente neste fruto tem despertado cada vez mais interesse no domínio do desenvolvimento de novos ingredientes alimentares, sobretudo como agente espessante e de estabilização, conferindo uma elevada consistência final às massas utilizadas na panificação (Bento, 2020; Vinha et al., 2016a)

Por outro lado, à semelhança dos hortofrutícolas, a bolota apresenta baixo teor de proteína, sendo considerada um alimento não proteico. No entanto, como este fruto é isento de glúten, é interessante

para o fabrico de alimentos sem glúten, destinados a celíacos, ou para a otimização de alimentos enriquecidos com aminoácidos essenciais, vitaminas, macro e microelementos e fibra dietética, podendo aumentar significativamente os seus valores nutricionais (Vinha et al., 2016a).

No que diz respeito ao conteúdo de lípidos nas sementes, os ácidos gordos mais abundantes na bolota são os ácidos oleico, palmítico e linoleico, o que pode ser encarado como uma mais-valia deste fruto, uma vez que os ácidos gordos insaturados como o ácido oleico e linoleico têm um efeito benéfico na saúde, particularmente nas DCV, por exemplo na regulação do perfil lipídico do sangue (Taib & Lyoussi, 2020).

As bolotas são também uma excelente fonte de minerais, tais como o cálcio, magnésio, potássio, ferro, cobre, manganês e zinco. O teor em minerais é muito importante, uma vez que estes participam em diversos processos metabólicos, como cofatores enzimáticos diretamente envolvidos nos processos da digestão, absorção e fornecimento de energia (Cruz, 2018).

Além do seu perfil nutricional, as bolotas também são estudadas pelo seu perfil e conteúdo fitoquímico. Neste sentido, este fruto apresenta altos teores de compostos fenólicos, como ácidos fenólicos, flavonoides e taninos, não só presentes na semente como também na casca (sub-produto mais abundante na transformação da bolota). Estes componentes são considerados os principais compostos bioativos presentes na bolota, fundamentais na dieta humana essencialmente para manter um nível adequado de antioxidantes, estando associados a diversas funções biológicas, tais como atividades anti tumorais, antialérgicas, anti plaquetárias, anti isquémicas, anti-inflamatórias e antioxidantes (Vinha et al, 2016c).

Embora a maioria das espécies de bolotas sejam comestíveis, algumas contêm elevados teores de taninos, responsáveis pelo amargor dos frutos, o que por vezes pode inibir a sua utilização na alimentação fazendo com que a bolota não seja tão apreciada pela população humana. A síntese destes compostos é um mecanismo de defesa da planta contra os predadores, porém, estes compostos podem proporcionar benefícios para a saúde humana pois possuem essencialmente propriedades antioxidantes, antibacterianas, anti-hemorrágicas, antidiarreicas e são também utilizados para tratar a fleuma (muco segregado pelas membranas mucosas) nos intestinos e no estômago. No entanto, em concentrações mais elevadas, os taninos podem ser tóxicos para o ser humano, perturbando a absorção de nutrientes, provocando danos no epitélio intestinal, bem como em tecidos do fígado e do rim (Szablowska, 2021).

Em resumo, a bolota, nomeadamente a sua semente, possui um perfil nutricional rico em compostos bioativos bastante interessante, com um elevado potencial para a IAA, destacando-se a sua importância para a diminuição do risco de DCV, doenças inflamatórias, diabetes, cancro, infeções microbianas e outras doenças. Estes benefícios devem-se essencialmente às suas propriedades antioxidantes, anti-tumorais e cardioprotetoras. A sua composição e valor nutricional fazem assim deste fruto uma matriz adequada para o desenvolvimento de novos produtos alimentares funcionais, isentos de glúten, através do aproveitamento sustentável de um recurso natural que até então tem sido desvalorizado (Vinha et al., 2016a).

2.3.2. Processamento e potenciais aplicações em produtos alimentares

A bolota foi sempre reconhecida pela sua importância na economia rural, quer na componente de alimentação humana quer animal. A sua utilização, especialmente na produção de farinha e pão, remonta ao século XIV, embora, em tempos mais recentes, a maioria seja utilizada para a alimentação

animal devido ao seu elevado teor de hidratos de carbono, proteínas e lípidos. No entanto, tendo em consideração o seu potencial nutricional e composição fitoquímica, o seu consumo pode ser valorizado tanto *in natura* como processada em produtos alimentares de alto valor agregado para a saúde (Vinha et al., 2016a).

Neste sentido, têm sido vários os estudos científicos que validam as inúmeras características benéficas da bolota na alimentação humana, sendo evidente que a utilização deste recurso natural irá aumentar drasticamente para diversas outras aplicações. Do ponto de vista das suas potenciais aplicações na nutrição humana, o consumo de bolota pode-se dividir em três categorias: consumo de bolota como nozes (semelhante a castanhas), como farinha (devido ao elevado teor de amido), ou como óleo alimentar (apresentando uma elevada semelhança com o azeite). Em todos estes casos, o processamento da bolota inclui normalmente o processo de descasque, torra ou de cozimento, o que pode gerar subprodutos com aplicações potenciais adicionais, especialmente os que resultam da produção de farinha ou da extração de óleo de bolota (Vinha et al., 2016b).

Deste modo, devido à sua matriz rica em amido, à sua melhor digestibilidade e ao seu baixo custo, a bolota tem sido investigada em vários estudos que indicam que possui propriedades biológicas superiores à farinha de trigo, nomeadamente por ter um elevado teor em fibras, podendo ser utilizada na produção de pão. Outra característica da farinha de bolota é a ausência de glúten, um fator relevante para a produção de produtos para celíacos, os quais requerem matérias-primas pré-selecionadas livres destas proteínas (Vinha et al., 2016a).

Relativamente à aplicação da bolota como óleo alimentar, diversos estudos relatam que o teor de óleo em algumas espécies pode variar entre os 5 -20% (Taib & Lyoussi). Além disso, alguns autores descrevem o óleo de bolota como tendo um sabor, valor nutricional e perfil lipídico idênticos ao do azeite, apresentando também uma boa estabilidade oxidativa. Em algumas espécies como a *Q. ilex* e a *Q. suber*, o perfil de ácidos gordos é idêntico a muitos óleos edíveis, como girassol, amendoim, algodão e abacate (Pacheco, 2015).

A nível industrial, a bolota já é utilizada como farinha e óleo comestível, sendo consumida também em refeições como substituto de nozes, amendoins ou azeitonas, incorporada em pão ou biscoitos, ou dando origem a licores e “substitutos” de café (Miranda, 2018). No entanto, pode ser desenvolvida uma grande diversidade de outros produtos alimentares inovadores e com valor acrescentado a partir deste fruto. Com isto, pesquisas científicas recentes demonstraram que a bolota e os seus subprodutos são um alimento com grande potencial para a saúde do ser humano tendo inclusive compostos que auxiliam no combate de DCV e de doenças como o Alzheimer e o cancro (Vinha et al., 2016a).

Pasqualone et al. (2019), investigaram a viabilidade da utilização da farinha de bolota como um ingrediente novo e saudável em biscoitos à base de trigo e compararam as características físico-químicas da farinha obtida a partir de três espécies diferentes de *Quercus* (*Q. ilex*, *Q. suber*, e *Quercus coccifera* L.) assim como avaliaram também as propriedades sensoriais dos mesmos. Para a obtenção das farinhas, as bolotas foram inicialmente descascadas, moídas e peneiradas e utilizadas diretamente para preparar os biscoitos sem qualquer pré-tratamento adicional. As farinhas obtidas mostraram ser ligeiramente doces e com níveis limitados de adstringência. Por outro lado, os biscoitos preparados mostraram um teor significativamente mais elevado de compostos fenólicos, atividade antioxidante e estabilidade oxidativa do que os biscoitos de controlo, preparados sem farinha de bolota, sendo que estas características melhoraram à medida que o nível de farinha de bolota aumentava. Quanto à aparência, os biscoitos com farinha de bolota eram mais escuros, maiores, mais volumosos e mais quebradiços do que os biscoitos de controlo. Desta forma, os autores concluíram que o enriquecimento

dos biscoitos com farinha de bolota provou ser uma estratégia muito eficaz para conferir propriedades antioxidantes aos biscoitos, sem alterar excessivamente as características sensoriais (Pasqualone et al., 2019).

Além da alfarroba, a bolota pode ser também outra alternativa para substituir o cacau em pó no fabrico de chocolate. Neste contexto, um estudo realizado por Marc et al. (2021) teve como objetivo estudar o pó derivado da bolota da espécie *Quercus rubra* L. como alternativa ao cacau em pó, a fim de obter um chocolate que não contenha estimulantes do sistema nervoso, avaliando o pó obtido quanto ao teor total de polifenóis e às propriedades antimicrobianas. Foram estudados diversos processos de torra em diferentes intervalos de tempo e temperatura de forma a otimizar o processo de torra para obter um perfil organoléptico tão próximo quanto possível do cacau em pó, no menor tempo possível. Com isto, os autores identificaram os seguintes parâmetros de torra mais adequados: 180 °C durante 25 min; 200 °C durante 20 min; e 220 °C durante 15 min. Após as análises efetuadas ao pó, os resultados demonstraram que a bolota é caracterizada por um elevado teor de compostos fenólicos responsáveis por numerosas funções fisiológicas, biológicas e bioquímicas devido à sua forte atividade antioxidante, tendo demonstrado também ser uma matéria prima bastante promissora com grandes quantidades de metabolitos secundários capazes de proporcionar proteção contra a contaminação microbiana, especialmente tendo a capacidade de inibir bactérias *Gram*-positivas. Em conclusão, este estudo comprovou que os frutos da *Q. rubra* são uma potencial alternativa ao cacau em pó no fabrico de chocolate (Marc et al., 2021).

O desenvolvimento e caracterização de bebidas à base de bolota também tem sido alvo de diversos estudos. Um estudo realizado por Costa (2014) teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de uma bebida funcional à base de bolota sem e com incorporação de bactérias probióticas, demonstrando, que ambas as bebidas promoveram um crescimento de bactérias benéficas na microbiota intestinal, para além do seu potencial antioxidante (Costa, 2014).

Por outro lado, Sardão et al. (2021) estudaram o desenvolvimento de uma bebida feita através da bolota da espécie *Q. ilex*, retirada da região de Montemor-o-Novo em Portugal e o efeito de um processamento a alta pressão dessa bebida. O efeito do processamento a alta pressão foi estudado para melhorar a segurança e a qualidade de uma bebida à base deste fruto, sendo que segundo os autores as bebidas à base de plantas como a bolota tem um prazo de validade muito curto e os tratamentos térmicos afetam a sua qualidade. As bolotas foram descascadas, lavadas e mergulhadas em água (10 g de bolota por 100 mL) durante a noite à temperatura ambiente, seguidamente foi removida a água lixiviada e as bolotas foram homogeneizadas com água (200 mL por 10 g de bolota) e filtradas através de um pano de linho. Estes autores propuseram uma solução para melhor reter as propriedades nutricionais e a qualidade sensorial, prolongando igualmente o prazo de validade. Esta investigação avaliou o impacto do processamento a alta pressão e do processamento térmico numa bebida de bolota durante 63 dias de armazenamento refrigerado, concluindo que o processo a alta pressão em particular prolongou a validade da bebida e melhorou tanto a qualidade físico-química, como a análise sensorial (Sardão, 2021).

Outra aplicação alimentar da bolota que também tem sido bastante investigada é a substituição do café tradicional por um café feito à base de bolota, isento de cafeína. Neste sentido, o estudo realizado por Sekeroglu et al. (2017) investigou a composição mineral dos cafés de bolota, tendo os resultados mostrado que este substituto de café contém minerais úteis e uma baixa composição de metais pesados perigosos, podendo ser consumidos em segurança como uma nova bebida saudável, com variados benefícios de saúde, apresentando-se com um grande potencial como produto industrial alimentar (Sekeroglu et al., 2017).

A alternativa do uso da bolota para o desenvolvimento sustentável de substitutos do café tem despertado igualmente muito interesse por parte de investigadores em Portugal, a fim de estimular a valorização deste recurso natural pouco explorado. Neste seguimento, os investigadores Pinto et al. (2019) estudaram uma bebida semelhante ao café a partir de sementes de *Quercus cerris* L. e avaliaram a composição nutricional do grão torrado assim como a atividade antioxidante, composição fenólica, viabilidade celular e efeitos tóxicos da bebida. Inicialmente, as bolotas foram processadas através da separação da semente da casca, seguido de uma secagem e posteriormente uma torra das sementes a uma temperatura de 200 °C durante 30 min, sendo por fim moídas em pó (2-3 mm). A preparação da bebida foi realizada através de uma extração de cerca de 8,8 g de amostra com 250 mL de água a 100 °C durante 5 min e finalizada por uma filtração. Neste estudo os autores constataram que as sementes apresentaram cerca de 60,4% de hidratos de carbono (dos quais 26,9% são fibras), 6,3% de proteínas e 4,0% de gordura, concluindo que este material vegetal pode ser considerado como uma fonte natural de biocompósitos com alto potencial antioxidante, estando associado à redução do risco de desenvolvimento de várias doenças como o cancro ou perturbações neurodegenerativas, sendo possível assim ser consumido como uma bebida funcional (Pinto et al., 2019).

Coelho et al. (2018) também desenvolveram uma bebida alternativa ao café obtida das espécies *Q. ilex* e *Q. suber* e avaliaram o efeito do processo de torra e caracterização funcional da mesma. Para tal, foram analisadas a capacidade antioxidante e a toxicidade da bebida desenvolvida e caracterizados os compostos fenólicos e ácidos gordos. Para este estudo apenas foram utilizados os cotilédones das bolotas, torrados num forno a uma temperatura entre 225-230 °C durante 15 min e moídos num moinho de café. A preparação da bebida foi efetuada usando uma cafeteira elétrica, com cerca de 4 g de amostra em pó em 50 mL de água durante 1 min, com água a 100 °C para um volume final de café de 50 mL. Os resultados obtidos mostraram que as bebidas preparadas apresentavam propriedades funcionais interessantes, como capacidade antioxidante e atividades anti mutagénicas associadas ao seu composto fenólico primário, o ácido elágico. Por outro lado, a torra resultou numa redução da concentração total de ácidos gordos e a produção da bebida não formou compostos tóxicos. Com isto, os autores concluíram que estes resultados demonstraram a viabilidade dos alimentos à base de bolota e o seu potencial para produzir uma bebida semelhante ao café tradicional.

Por fim, é notório que a caracterização abrangente da bolota pode levar a um aumento do seu valor acrescentado para diversas aplicações em produtos alimentares, havendo, no entanto, uma forte necessidade de desenvolver mais estudos para a produção de produtos inovadores que usem este recurso natural, muitas das vezes tão desvalorizado.

2.4. A Alfarroba

A alfarroba é o fruto da alfarrobeira, cujo nome científico é *Ceratonia siliqua* L., uma árvore leguminosa de folha persistente pertencente à família *Fabaceae*, que cresce espontaneamente e tem sido amplamente cultivada em toda a região do mediterrâneo, sendo considerada um importante componente da vegetação por razões económicas e ambientais. A família *Fabaceae*, para além de ser uma das famílias de plantas mais numerosas, está amplamente distribuída um pouco por todo o mundo nas regiões onde o clima é tropical, subtropical ou temperado (Batlle, & Tous, 1997).

Em 2018, a produção de alfarroba no mundo foi de 165 mil toneladas sendo que os países com os maiores volumes de produção de alfarroba foram Portugal (43 mil toneladas), Itália (29 mil toneladas) e Espanha (23 mil toneladas), representando em conjunto 58% da produção global (GlobalTrade, 2020).

Portugal é assim o maior produtor de alfarroba, sendo que a sua produção abrange principalmente a região do Algarve ocupando uma área de 12 mil ha e algumas zonas do Alentejo, devido essencialmente aos solos pobres destas regiões, uma vez que esta árvore praticamente não precisa de água. Este facto, torna assim o estudo das características e propriedades dos produtos da alfarrobeira extremamente importante para um melhor aproveitamento desta árvore e do seu fruto, a alfarroba. Na Figura 6, encontra-se uma representação da distribuição geográfica da alfarrobeira em Portugal, sendo que as variedades mulata e galhosa são as mais comuns no território nacional (Pessoa, 2013).



Figura 6. Distribuição geográfica do cultivo da alfarroba a nível mundial (a preto no mapa) e nacional (a verde no mapa). Adaptado de (Batlle, & Tous, 1997; UTAD, 2022).

Durante séculos, a alfarroba foi utilizada para os mais diversos fins, nomeadamente para o consumo humano e animal devido à sua disponibilidade e fácil adaptação da árvore a habitats isentos de água. Atualmente é sobretudo usada na alimentação humana como substituto do cacau ou do chocolate na confeção de doçarias e licores, sendo também amplamente utilizada como agente estabilizador e espessante numa vasta gama de produtos alimentares comerciais. No entanto a maioria das vagens de alfarroba são descartadas e não são atualmente utilizadas de forma eficaz (Alvarez, 2013).

Porém, o maior potencial da alfarroba está na possibilidade da sua utilização no combate a diversas doenças tais como o cancro e doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, devido essencialmente às suas propriedades nutricionais, podendo ser incorporada na formulação de produtos cardioprotetores e antimicrobianos (Alvarez, 2013).

2.4.1. Composição e valor nutricional

A alfarroba é uma vagem indeiscente de cor acastanhada, com uma superfície enrugada e ligeiramente curvada que, quando madura, possui 10 a 25 cm de comprimento, sendo constituída por cerca de 90% de polpa e 10% de sementes. As sementes são rijas e numerosas, possuindo uma película exterior de cor castanha, enquanto a casca é dura e macia. Na Figura 7 é possível visualizar a divisão das duas partes da vagem deste fruto (Duarte, 2018).



Figura 7. Constituição da vagem da alfarroba (Pessoa, 2013).

A semente de alfarroba é constituída pelo invólucro, pelo endosperma branco e translúcido e pelo germe ou embrião, representando em peso seco, 30-33%, 42-46% e 23-25% da semente, respetivamente. Estas sementes são utilizadas na indústria alimentar essencialmente pelo seu conteúdo em goma, visto que conseguem atuar como espessantes, emulsionantes e estabilizantes, modificando a textura de diversos alimentos processados. Contudo, já existem inúmeras aplicações para o aproveitamento das sementes, o que não acontece com a polpa, sendo esta o maior constituinte da vagem deste fruto (Pessoa, 2013).

Deste modo, a polpa da vagem é a fração menos utilizada da alfarroba, sendo considerada um subproduto do aproveitamento da semente. Apenas cerca de um terço desta polpa é consumida como alimento para animais ou utilizada para a produção de farinha de alfarroba, na confeitaria regional, principalmente como substituto do chocolate ou aplicada em produtos dietéticos, uma vez que é isenta de glúten. No entanto, devido às suas propriedades nutricionais e à sua composição química, esta fração representa uma mais-valia para a valorização da vagem de alfarroba na sua globalidade (Duarte, 2018).

Em relação à composição química, a polpa da alfarroba é constituída essencialmente por hidratos de carbono (predominantemente a sacarose), proteínas, lípidos, fibra, compostos minerais e vitaminas. Nos extratos de polpa também se pode encontrar a presença de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e maioritariamente polinsaturados. Esta composição, por outro lado, varia muito de acordo com as variedades de alfarroba e das condições edafoclimáticas, assim como o tempo de colheita (Alvarez, 2013; Duarte, 2018). Na Tabela 4 encontra-se apresentada a composição química e nutricional da polpa da alfarroba.

Tabela 4. Composição química e valor nutricional da alfarroba (Avallone et al.,1997; Batlle, & Tous, 1997; Duarte, 2018; Loullis & Pinakoulaki, 2018)

Composição da alfarroba		
	Água (%)	6,00 – 11,00
	Hidratos de carbono totais (%)	40 – 60
Açúcares (%)	Sacarose	30 – 38
	Frutose	5 – 7
	Glucose	5 – 6
	Proteínas (%)	1,00 – 5,00
	Lípidos totais (%)	0,40 – 0,80
Ácidos gordos (%)	Ácidos gordos saturados	0,09
	Ácidos gordos monoinsaturados	0,197
	Ácidos gordos polinsaturados	0,216
	Fibra (%)	25 – 39,8
	Cinzas (%)	2,00 – 3,40
	Taninos condensados (%)	18 – 20
	Pinitol (%)	5 – 7
Principais componentes minerais (mg/100 g)	Potássio	827
	Cálcio	307
	Fósforo	79
	Magnésio	42
	Sódio	13
	Ferro	2,94
	Zinco	0,92
Principais vitaminas (mg /100 g)	Folato (Vitamina B9)	29
	Niacina	1,897
	Vitamina E	0,63
	Riboflavina	0,461
	Vitamina B6	0,366
	Vitamina C	0,2
	Tiamina	0,053

A polpa de alfarroba possui ainda na sua composição compostos fenólicos, sendo estes constituídos essencialmente por taninos condensados – compostos polifenólicos complexos que se

encontram presentes numa grande variedade de alimentos e produtos alimentares de origem vegetal (Batlle, & Tous, 1997). É composta também por outros polifenóis como flavonoides e ácidos fenólicos, sendo que de uma forma geral, os polifenóis podem exibir principalmente propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimutagénicas e anticarcinogénicas, desempenhando um papel importante na prevenção e redução do cancro e de doenças cardíacas, quando incluídos na dieta diária (Owen et al., 2003).

Contudo, os seus taninos que estão presentes na fração de fibra alimentar são um dos compostos que contribuem para o sabor amargo, sendo também responsáveis por um efeito de adstringência. Desta forma apresentam características particulares que fazem com que a farinha de alfarroba, derivada da polpa, seja muitas vezes utilizada como antidiarreico, beneficiando a flora intestinal (Da Silva, 2009).

Por outro lado, estudos recentes demonstraram que a fibra de alfarroba também possui um elevado poder de redução do colesterol que é ingerido diariamente, uma vez que uma dieta rica em fibra alimentar é conhecida por exercer uma variedade de efeitos fisiológicos, incluindo uma melhor digestão e atenuação do colesterol sanguíneo e níveis de glicose, apresentando também potencial para a prevenção contra certos cancros, em particular os do trato gastrointestinal (Da Silva, 2009).

Outro componente da polpa de alfarroba é o pinitol, que constitui cerca de 5 a 7% do peso do fruto seco. Este constituinte assume um papel importante na composição da alfarroba visto que tem sido identificado como tendo um efeito antidiabético, diminuindo a concentração de glucose no sangue (Pessoa, 2013).

Outra vantagem do uso da alfarroba é que a farinha derivada da polpa da vagem torrada e moída pode ser utilizada para substituir o cacau, pois apresenta vantagens nutricionais sobre o mesmo, na medida que comparando os nutrientes de ambos, verifica-se que enquanto o cacau possui até 23% de gordura e 5% de açúcar, a alfarroba possui 0,4 a 0,8% de gordura e um alto teor de açúcares naturais (sacarose, frutose e glucose), em torno de 30-38%. A alfarroba é ainda menos calórica que o cacau e não contém cafeína nem teobromina, dois fortes estimulantes do sistema nervoso e do ritmo cardíaco, que podem ser inclusive transmitidos aos bebés através do leite materno, e em certas pessoas, a teobromina desencadeia reações alérgicas visíveis (Da Silva, 2009). No entanto, o seu sabor não é tão rico quanto o chocolate escuro, mas assemelha-se a leite com chocolate (Alvarez, 2013).

Deste modo, devido à sua composição única, abundância em hidratos de carbono, fibra, compostos fenólicos e outros compostos bioativos, a alfarroba possui um grande potencial para ser utilizada como ingrediente funcional na produção de produtos alimentícios com diversos efeitos benéficos para a saúde (Duarte, 2018).

2.4.2. Processamento e potenciais aplicações em produtos alimentares

Como já foi referido anteriormente, a polpa de alfarroba é o maior constituinte do fruto da alfarrobeira e tem na sua composição uma forte componente em açúcares que lhe confere um elevado potencial de valorização na indústria alimentar (Pessoa, 2013).

Neste contexto, podem ser obtidos diversos tipos de xarope de alfarroba através da extração dos açúcares que constituem a polpa, sendo as suas aplicações mais comuns em licores, cremes ou pastas de barrar, batidos, sumos, café, iogurtes, doces, entre outros produtos (Pessoa, 2013).

A alfarroba tem sido também comumente utilizada em forma de farinha, na produção de diversos produtos alimentares como produtos de panificação, massas, bolos, como substituto de cacau ou do chocolate, em produtos dietéticos e produtos para doentes celíacos. A farinha pode advir tanto da semente como da polpa, sendo mais comum o uso da polpa para este processo (Papaefstathiou et al., 2018). Deste modo, a produção da farinha dá-se inicialmente através de uma limpeza e secagem natural das vagens, que depois de secas, as polpas são separadas das sementes e passam novamente por uma limpeza, após este processo a polpa é submetida a um tratamento térmico, que de acordo com o tempo e temperatura que são submetidas, consegue-se obter as várias tonalidades e sabores diferentes encontradas na farinha produzida através da torra e moagem das vagens da alfarroba (Da Silva, 2009).

No entanto uma grande parte do subproduto da alfarroba, a polpa, é desperdiçada e consequentemente desvalorizado, sendo que diversos estudos científicos comprovam que este recurso natural pode ser uma mais-valia para a saúde quando devidamente processado ou incorporado em produtos processados, apresentando assim um grande potencial para a indústria alimentar.

Um estudo efetuado por Rosa et al. (2015) avaliou o efeito da substituição de cacau em pó por farinha de alfarroba comercial em bolos sem glúten, feitos com a adição de farinhas de soja e de banana. Nesta investigação foram preparadas cinco formulações de bolos com diferentes níveis de alfarroba, com 100% cacau em pó (sem alfarroba), 25% farinha de alfarroba, 50% farinha de alfarroba, 75% farinha de alfarroba e 100% farinha de alfarroba, e foram analisados diversos parâmetros químicos (humidade, hidratos de carbono, lípidos, proteínas, fibra dietética, cinzas e energia), físicos (altura e peso) e sensoriais (cor, odor, sabor e textura). Neste seguimento, os autores descreveram que a substituição do pó de cacau por farinha de alfarroba deu aos bolos um teor mais elevado de fibras alimentares e níveis mais baixos de lípidos e hidratos de carbono, e de calorias. Por outro lado, as análises físicas mostraram que à medida que a substituição do cacau em pó por farinha de alfarroba aumentava, o rendimento aumentava, ou seja, aumentavam de peso. A análise da textura mostrou que a substituição parcial ou total do pó de cacau por farinha de alfarroba diminuiu a elasticidade, resiliência e coesão e os bolos com até 75% de substituição do cacau em pó por farinha de alfarroba não mostraram diferença em termos de sabor, odor e textura, demonstrando que a substituição até este nível não influenciou os atributos sensoriais (Rosa et al., 2015).

Num outro estudo realizado por Aydın & Özdemir (2017), foi desenvolvido e caracterizado um creme pastoso para barrar, a partir de farinha de alfarroba, com a finalidade de ser usado como lanche nutritivo para crianças. Investigaram-se as propriedades relacionadas com a textura, propriedades sensoriais, como a cor e algumas propriedades nutricionais do produto, sendo que os resultados mostraram que a pasta produzida contendo 38 g de farinha de alfarroba e 42 g de óleo de palma hidrogenado (para 100 g de pasta de alfarroba) era bastante aceitável para consumo, sendo quase igualmente fácil de espalhar o creme, como os confeccionados com chocolate (Aydın & Özdemir, 2017).

As propriedades cardioprotetoras da alfarroba em produtos alimentares também tem sido alvo de diversos estudos, sendo que Zunft et al. (2001) desenvolveram diversos alimentos contendo uma preparação de polpa deste fruto, em específico para o tratamento da hipercolesterolemia (colesterol elevado no sangue). Esta investigação teve como objetivo fazer um estudo-piloto, testando esses produtos em voluntários com hipercolesterolemia moderada, demonstrando se a ingestão diária de 15 g de alfarroba incorporada em três produtos alimentares, nomeadamente cereais de pequeno-almoço, barras de cereais de fruta e bebida em pó, pode afetar os níveis de colesterol total e colesterol LDL no sangue. Com isto, os investigadores concluíram que a ingestão destes alimentos contendo níveis elevados de fibras alimentares e polifenóis produziram uma redução altamente significativa e

cl clinicamente relevante nos níveis de colesterol total e LDL no sangue. Este efeito foi máximo após 6 semanas, onde foram observadas reduções de 7,8% no colesterol total e 12,2% no colesterol LDL, porém os valores dessa altura eram apenas ligeiramente inferiores aos valores após 4 semanas sendo que as respectivas diminuições foram 7,1% e 10,6%. Além desses resultados, a formulação da preparação foi bem aceite pelos consumidores, potenciando uma vez mais o uso da alfarroba na preparação de alimentos funcionais com efeitos benéficos para o tratamento de diversas doenças (Zunft et al., 2001).

A influência de diferentes processos de torra da polpa da alfarroba também tem sido alvo de diversos estudos. Boublenza et al. (2017) estudaram e compararam o efeito da temperatura nos parâmetros físico-químicos, atividade antioxidante, composição lipídica e análise sensorial em amostras de polpa de alfarroba não torrada e torrada a diferentes temperaturas de torra para obter produtos diferentes em termos de cor, aroma e sabor. Após a colheita das alfarrobas maduras, estas foram limpas, misturadas, esmagadas e retiradas as sementes seguindo para o processo de torra num torrador artesanal a diferentes temperaturas, durante o mesmo tempo de processamento (20 min). Desta forma, as amostras foram sujeitas a quatro condições diferentes: C0 – não torrada; C1 – torrada a 110 °C; C2 – torrada a 130 °C; C3 – torrada a 150 °C. Posteriormente as amostras torradas foram moídas e preparadas para análise. Com isto, Boublenza et al. (2017) verificaram que os produtos torrados se tornaram mais escuros e o teor médio de humidade, teor de óleo e valores de doçura diminuíram a temperaturas de torra mais elevadas. Por outro lado, o teor total de polifenóis e a atividade antioxidante aumentaram com o aumento da temperatura de torra. Por fim, os autores também constataram que a amostra C1 foi a mais doce, com mais sabor a caramelo e mais aroma a cacau e a amostra C3 obteve um sabor mais adstringente, mais aroma a café e aroma torrado comparativamente aos restantes, concluindo assim que a polpa de alfarroba torrada pode ser usada como ingrediente alimentar em diferentes tipos de alimentos e também como suplemento dietético (Boublenza et al., 2017).

Şahin et al. (2009) também investigaram como as condições de torra podem afetar as características químicas do pó final de alfarroba. Foram monitorizadas algumas alterações químicas, tais como teor fenólico total, atividade antioxidante total, índice de escurecimento, absorvância UV e pH durante a torra da alfarroba. O processo de torra foi realizado a diferentes combinações de tempos e temperaturas, no qual foram atingidas temperaturas de 135 °C, 150 °C e 165 °C em intervalos de tempo de aquecimento de 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, e 90 min, sendo que as amostras torradas foram posteriormente moídas e passadas através de uma peneira para análise. Os resultados deste estudo revelaram que enquanto os valores de teor fenólico total, atividade antioxidante total, índice de escurecimento e absorvância UV das amostras aumentaram com o aumento da temperatura e tempo de torra, o pH das amostras diminuiu gradualmente. Desta forma, os autores verificaram que tanto a temperatura como o tempo de torra afetaram fortemente as propriedades químicas do pó de alfarroba, no entanto, o tempo de torra foi um fator crítico que determinou a qualidade global do produto, uma vez que as características de qualidade do pó de alfarroba mudaram acentuadamente entre 20 e 60 min de torra a todas as temperaturas testadas, o que indica que as reações induzidas pelo calor aceleram particularmente durante esse período de torra. Por conseguinte, Şahin et al. (2009) concluíram que o grau ótimo de torra pode ser padronizado neste intervalo de tempo tendo em conta a influência da temperatura de torra (Şahin et al., 2009).

Estes são apenas alguns de diversos estudos científicos que têm explorado o uso da alfarroba e dos seus subprodutos, nomeadamente a polpa, assim como estudado diversos tipos de processamento para a aplicação em produtos alimentares.

Em resumo, atualmente é cada vez mais importante uma adaptação sustentável do sistema alimentar, sendo vantajoso e importante recorrer ao aproveitamento de matrizes vegetais ricas em nutrientes e compostos bioativos para o combate a diversas doenças do sistema cardiovascular que causam a morte a milhões de indivíduos todos os anos.

3. Parte Experimental

3.1. Amostras e preparação para processamento e análise

As amostras selecionadas para este trabalho foram a bolota de carvalho-alvarinho (*Quercus robur* L.) e a alfarroba (*Ceratonia siliqua* L.). As bolotas foram recolhidas em meados de outubro/novembro de 2021 numa floresta privada na região do Minho e as vagens de alfarroba foram adquiridas a um vendedor local na região de Tavira, no Algarve, sendo que ambos os frutos foram adquiridos inteiros.

O pré-tratamento das bolotas foi iniciado pela desidratação das mesmas num desidratador alimentar (Excalibur 9 Tray Dehydrator, Model 4926 T, USA) a 41 °C durante cerca de 72 h, de forma a evitar a degradação de compostos termolábeis, tal como indicado pelo fabricante. Após esse período, algumas bolotas desidratadas foram lavadas com vinagre para eliminar possíveis fungos presentes, sendo posteriormente separado o pericarpo e a testa da bolota, resultando apenas na parte edível (embrião). Para a realização das análises foram moídos cerca de 100 a 200 g de amostra num moinho (ZM 200, Retsch, Haan, Alemanha) e separou-se as partículas por tamanho com um agitador de peneiros (AS 200 Basic, Retsch) de 2 mm até se obter um pó fino, sendo que as restantes amostras não moídas foram congeladas numa arca congeladora a -80 °C.

Relativamente às alfarrobas, as suas vagens foram inicialmente cortadas em pedaços pequenos, cerca de 0,5-1 cm, de seguida separou-se a polpa da semente e desidratou-se a polpa no desidratador alimentar a 41 °C durante cerca de 48 h. Para a realização das análises foi usada uma picadora (Moullinex) para moer as amostras desidratadas até se obter um pó fino sendo as restantes amostras não moídas congeladas a temperatura ultrabaixa (-80°C).

Para este projeto estabeleceu-se utilizar apenas a polpa da alfarroba uma vez que é a fração menos aproveitada da vagem deste fruto, sendo considerada um subproduto do aproveitamento da semente que é usada para inúmeras outras aplicações (Duarte, 2018).

A Figura 8 representa as matrizes durante o seu pré-tratamento e preparação para análise.



Figura 8. Pré-tratamento da bolota e da alfarroba.

3.2. Reagentes

Cloreto de sódio (NaCl), metanol (CH₃OH), clorofórmio (CHCl₃), n-hexano, e ácido bórico (H₃BO₃) foram obtidos na VWR (Leuven, Bélgica e Gliwice, Polónia). Acetona (C₃H₆O), aminometano (Tris-HCl), albumina de soro bovino (BSA), fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), fosfato de potássio dibásico tri-hidratado (K₂HPO₄·3H₂O), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS), glicose mono-hidratada, persulfato de potássio (K₂O₈S₂), carbonato de sódio (Na₂CO₃), reagente de Folin-Ciocalteu, ácido gálgico, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), nitrito de sódio (NaNO₂), substrato 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosido, enzima α -glucosidase, enzima α -amilase, butilhidroxitolueno (BHT), catequina e (-)-epicatequina foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos da América e Steinheim, Alemanha). Etanol 80% (C₂H₅OH), ácido clorídrico (HCl) e ácido sulfúrico (H₂SO₄ 98%) foram obtidos da Honeywell (Charlotte, North Carolina, Estados Unidos da América). Fenol, octanol, cloreto de cézio (CsCl) e amido solúvel foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Ácido nítrico 65% (HNO₃) cloreto de alumínio (AlCl₃), soluções-padrão de sódio (Na), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) para absorção atómica foram obtidos da Carlo Erba Reagents (Chau. du Vexin, Val-de-Reuil, França). A vanilina foi adquirida na Fluka (St. Louis, MO, Estados Unidos da América e Steinheim, Alemanha). O kit para a determinação pelo método de Bradford (proteomics grade) foi adquirido na Amresco (Solon, Ohio, Estados Unidos da América). O catalisador Kjeldahl (com 1,5% CuSO₄·5H₂O e 2% Se) e o hidróxido de sódio (NaOH) foram obtidos na Panreac (Barcelona, Espanha).

3.3. Processamento das bebidas funcionais e Análise sensorial preliminar

A preparação das bebidas funcionais foi realizada em três etapas: i) torra das matrizes, ii) moagem e iii) extração com água a ferver das amostras em pó.

Numa fase inicial foram testados vários graus de torra das matrizes em diferentes intervalos de tempo e temperatura utilizando um forno, de forma a realçar o aroma e obter características organolépticas tão próximas quanto possível das do café. Como demonstrado na Tabela 5 foram efetuados dois processos de torra à bolota – B15 (200 °C por 15 min) e B30 (200 °C por 30 min) e três à alfarroba – A10 (150 °C por 10 min), A20 (150 °C por 20 min) e A30 (150 °C por 30 min).

Tabela 5. Diferentes graus de torra estudados para a bolota e alfarroba.

Matrizes	Torra das matrizes	Tempo (min)	Temperatura (°C)
Bolota	B15	15	200
	B30	30	
Alfarroba	A10	10	150
	A20	20	
	A30	30	

Estas condições de torra foram selecionadas com base em alguns estudos realizados anteriormente, nomeadamente Coelho et al. (2018) que avaliaram diversos graus de torra das bolotas e determinaram que as melhores condições de torra estudadas variaram a uma temperatura de 180-220 °C e um intervalo de tempo de 10-25 min. Por outro lado, Boublenza et al. (2017), constatou que a torra da polpa da alfarroba a 150 °C durante cerca de 20 min era a mais adequada para se obter um aroma torrado e mais parecido com o café.

Após o processo de torra das matrizes, as amostras foram moídas individualmente num moinho de café elétrico (SilverCrest, Neckarsulm, Alemanha) até se obter um pó fino. Nas Figuras 9 e 10 é possível verificar o aspeto e a cor final das matrizes torradas e moídas, da bolota e da alfarroba respetivamente.



Figura 9. Torra e pó obtido das bolotas processadas: A) B15 e B) B30.

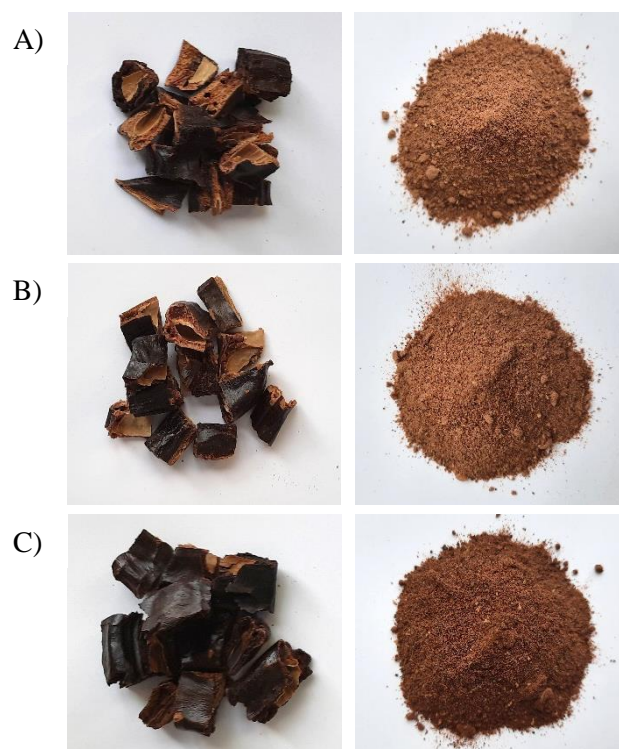


Figura 10. Torra e pó obtido das alfarrobas processadas: A) A10; B) A20 e C) A30.

De seguida, as amostras em pó foram sujeitas a uma análise sensorial preliminar onde foram realizadas várias extrações com água a ferver. Com isto, avaliaram-se as bebidas resultantes da extração de cada amostra individualmente e também se testaram diversas formulações de bebidas com o objetivo de selecionar as melhores combinações que se aproximavam das características organoléticas, como o sabor, cor, aroma e textura de um café expresso.

Nas Tabelas 6 e 7 encontra-se a análise sensorial efetuada às bebidas preparadas da extração de cada amostra individual (Tabela 6) e algumas das formulações testadas com diferentes porções de amostra (Tabela 7).

Tabela 6. Testes sensoriais preliminares das bebidas individuais.

	Sabor	Cor	Aroma	Textura
B15	Amargo; pouco intenso; alguma adstringência	Amarelada; médio-clara	Pouco intenso	Muito aguado
B30	Bastante amargo; intenso (semelhante ao café); alguma adstringência	Acastanhada; escura	Intenso; aroma a café	Menos aguado; corpo/densidade
A10	Bastante doce; mais leve; adstringente	Acastanhada/avermelhada; médio-escura	Muito adocicado	Aguado
A20	Muito doce; adstringente	Acastanhada/avermelhada; médio-escura	Adocicado	Aguado
A30	Doce; muito adstringente; intenso	Acastanhada/avermelhada; escura	Adocicado	Aguado

Tabela 7. Testes sensoriais preliminares de algumas das formulações testadas.

	Sabor	Cor	Aroma	Textura
50%B30 + 25%A30 + 25%A10	Agradável; entre doce e amargo;	Acastanhada; médio-escura	Intenso; adocicado	Aguado
75%B30 + 25%A30	Agradável; amargo; intenso; adstringente	Acastanhada; mais escura	Intenso; amargo	Menos aguado; corpo/densidade
50%A10 + 25%A30 + 25%B30	Agradável; doce; adstringente	Acastanhada/avermelhada; escura	Muito adocicado	Aguado
50% B30 + 50% A20	Amargo; muito adstringente	Acastanhada; escura	Pouco intenso	Aguado
75% A10 + 12,5% A20 + 12,5% B30	Muito doce; muito adstringente	Acastanhada/avermelhada; médio-escura	Intenso; adocicado	Aguado
50% A10 + 25% B30 + 25% B15	Pouco agradável; amargo; adstringente	Acastanhada; médio-escura	Pouco intenso	Aguado
33% B30 + 33% A30 + 33% A10	Mais amargo que doce; adstringente	Acastanhada; médio-escura	Pouco intenso; amargo	Aguado
50% B15 + 50% A30	Pouco agradável; amargo; muito adstringente	Acastanhada; médio-escura	Adocicado	Muito aguado

A partir da análise sensorial preliminar efetuada, foi possível verificar as diferenças nas características organolépticas entre as matrizes e também entre os seus graus de torra. Nos testes individuais constatou-se que as bebidas de bolota torrada apresentam um sabor amargo e intenso (semelhante ao café), com presença de mais corpo/densidade quando comparado à alfarroba torrada que apresenta um sabor bastante doce e uma textura mais leve e aguada. Notou-se igualmente que a bebida B30 apresentou características mais agradáveis e semelhantes às de um café amargo do que a B15, onde o sabor não agradou os provadores, o que se pode apurar que o tempo de torra não foi suficiente. Por outro lado, observou-se que quanto maior o tempo de torra da alfarroba, menos doce se torna e maior é a sensação de adstringência.

Após os testes sensoriais preliminares que foram feitos com diversas formulações, selecionaram-se três bebidas que pudessem agradar a diferentes gostos pessoais dos consumidores: B1 (50%B30 + 25%A30 + 25%A10) uma bebida nem muito amarga nem muito doce, ideal para quem gosta de café de torra mais clara; B2 (75%B30 + 25%A30) uma bebida mais amarga, ideal para quem gosta de café sem açúcar e de torras mais escuras; e B3 (50%A10 + 25%A30 + 25%B30) para quem gosta de um café mais doce.

A amostra B15 não foi selecionada para fazer parte de nenhuma das bebidas escolhidas pois tanto de forma individual como nas formulações verificou-se que a sua extração adicionava um sabor desagradável às bebidas finais, e a A20 também não foi usada para nenhuma das formulações finais por uma questão de exclusão de partes, visto que as preferências dos provadores às formulações

apresentadas não incluíam essa amostra. Por esse motivo as duas amostras B15 e A20 foram rejeitadas e não foram caracterizadas.

Os testes sensoriais e a preparação das bebidas finais foram realizados utilizando água mineral comercial em ebulição, filtros de café (nº4), um coador e um recipiente para armazenar a bebida. Na Figura 11 encontra-se uma demonstração dos testes sensoriais realizados.

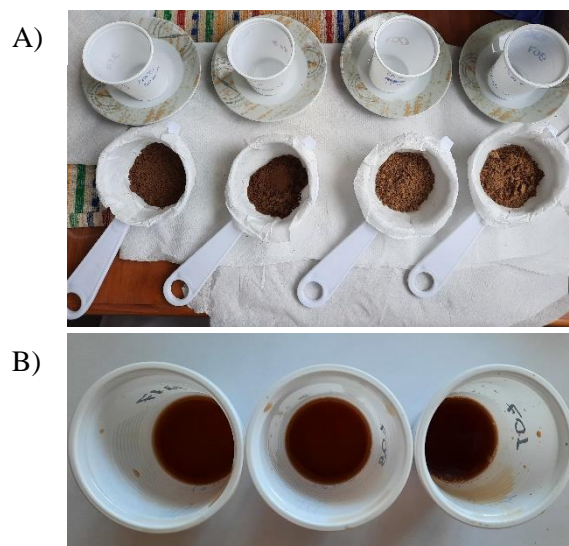


Figura 11. Demonstração dos testes sensoriais preliminares: A) Preparação para a extração das amostras; e B) Prova das bebidas teste.

Para a preparação das três bebidas funcionais foi utilizado uma dosagem de extração de 10 g de amostra em pó por 100 mL de água, a dosagem típica para um café de filtro. De forma a comparar as bebidas preparadas neste projeto com bebidas comerciais decidiu-se analisar um café em grão torrado e moído de moagem fina e um dos principais substitutos de café, cevada em grão torrado e moído. O café (CF) e a cevada (CEV) foram preparados de acordo com a dosagem recomendada nos seus rótulos, sendo as medidas 7 g de CF e 8 g de CEV para um volume total de água de 100 mL.

Na Figura 12 é possível verificar as diferentes bebidas extraídas e prontas para análise.

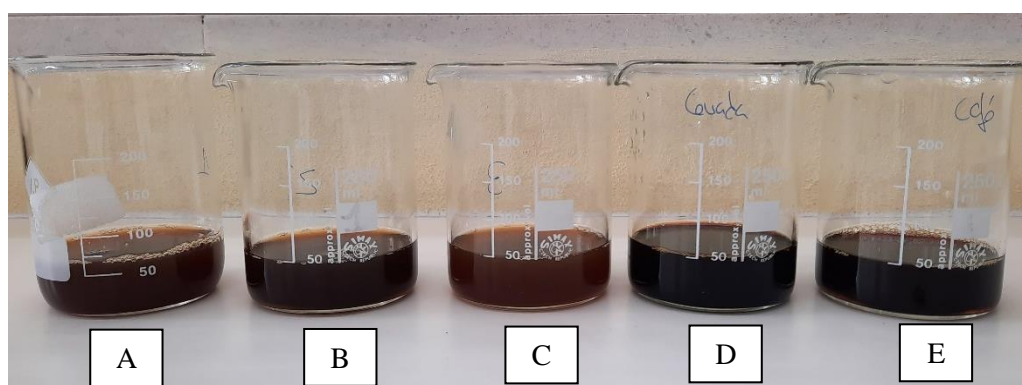


Figura 12. Bebidas preparadas para análise: A – B1 (50%B30 + 25%A30 + 25%A10); B – B2 (75%B30 + 25%A30); C – B3 (50%A10 + 25%A30 + 25%B30); D – CEV; E – CF.

3.4. Determinação da composição química e nutricional

Para determinar a composição química e nutricional das matrizes (bolota e alfarroba), das respetivas torras utilizadas no produto final (B30, A30 e A10) e das bebidas (B1, B2, B3, CF e CEV) foram determinados: i) humidade e sólidos totais; ii) teor de cinzas; iii) lípidos totais; iv) proteínas totais nas amostras sólidas e proteínas solúveis; v) açúcares totais; vi) fibras insolúveis; e vii) minerais.

3.4.1. Humidade e sólidos totais

O teor de humidade e de sólidos totais foram determinados pelo método de secagem em estufa das amostras sólidas e líquidas respetivamente. Foram realizadas secagens repetidas das amostras sólidas (cerca de 2 g) e amostras líquidas (cerca de 50 mL) em cápsulas de porcelana numa estufa (P Selecta, Barcelona, Spain), a 105 °C, seguido de um arrefecimento num exsiccador até atingir a temperatura ambiente. O processo prolongou-se durante alguns dias e terminou quando se atingiu um peso constante de amostra, verificado através de pesagens numa balança analítica (AOAC, 2005). Todas as análises foram realizadas em triplicado.

Na Figura 13 encontram-se representados os cadinhos de porcelana contendo as amostras sólidas e as bebidas preparadas após a secagem na estufa.

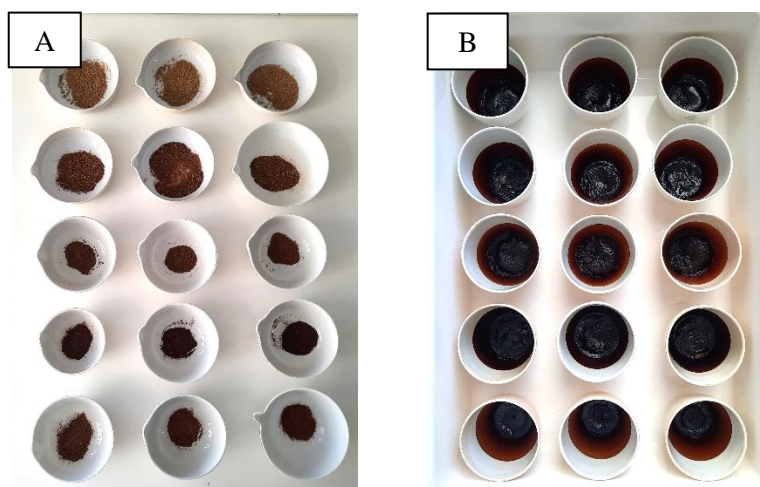


Figura 13. Secagem em estufa: A) Amostras sólidas após secagem; B) Bebidas após secagem.

O cálculo do teor de humidade, da matéria seca e do teor de sólidos totais foram realizados conforme a Equação 1, Equação 2 e Equação 3, respetivamente:

$$\text{Humidade (\% g/100g)} = \frac{\text{Massa amostra}_{\text{humida}}(\text{g}) - \text{Massa amostra}_{\text{seca}}(\text{g})}{\text{Massa amostra}_{\text{humida}}(\text{g})} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

$$\text{Matéria seca (\% g/100g)} = 100\% - \text{Teor de humidade (\%)} \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{Sólidos Totais (\% g/100mL)} = \frac{\text{Massa amostra}_{seca}(g)}{\text{Volume amostra inicial (mL)}} \times 100$$

Equação 3

As análises foram realizadas em triplicado.

3.4.2. Cinzas (matéria inorgânica)

O teor de cinzas foi determinado pelo método de incineração seca numa mufla. Esta técnica de incineração seca refere-se à utilização de um forno que é capaz de manter temperaturas altas, cerca de 500-600 °C, de forma a queimar toda a matéria orgânica contida nas amostras até se obter cinzas. A água e os compostos voláteis são vaporizados e as substâncias orgânicas são queimadas na presença de oxigénio para CO₂ e óxidos de nitrogénio. Desta forma, a maioria dos minerais são convertidos em óxidos, sulfatos, fosfatos, cloretos e silicatos (Nielsen, 2010).

Dado que certos alimentos são ricos em minerais específicos, o teor de cinzas torna-se importante uma vez que é um indicativo do conteúdo total de minerais presente em alimentos, permitindo assim fazer uma análise ao seu valor nutricional.

Para esta determinação, as amostras foram identificadas em cápsulas de porcelana e colocadas para incineração numa mufla (Nabertherm B-180, Lilienthal, Alemanha) a 600 °C durante 6 h. Após o término do processo, as amostras foram arrefecidas num exsiccador até atingir a temperatura ambiente e pesadas numa balança analítica (AOAC, 2005).

Na Figura 14 encontram-se representados os cadinhos de porcelana contendo as amostras sólidas e as bebidas respetivamente, após o processo de incineração. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

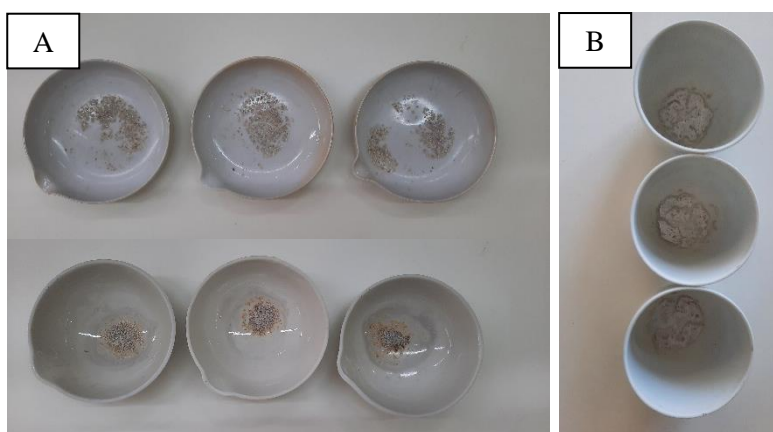


Figura 14. Incineração seca: A) Amostras sólidas após incineração; B) Bebidas após incineração.

Para a determinação quantitativa das cinzas totais calculou-se a percentagem de cinzas por meio da Equação 4 e Equação 5.

$$\text{Coeficiente matéria seca} = \frac{\% \text{ Teor de matéria seca}}{100}$$

Equação 4

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{\text{Massa (cinzas + cadinho) após incineração} - \text{Massa cadinho vazio}}{\text{Massa amostra inicial} \times \text{coeficiente matéria seca}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

3.4.3. Lípidos totais

Os lípidos totais das amostras foram extraídos utilizando o método de Folch de acordo com Folch et al (1957) e Ramalhosa et al (2012), com pequenas alterações. Esta técnica é uma extração a frio e é considerada uma das mais fiáveis para a recuperação completa de lípidos totais para amostras tanto sólidas como líquidas. O seu princípio de funcionamento baseia-se na partição de lípidos numa mistura bifásica contendo clorofórmio e metanol: após a adição do clorofórmio (solvente orgânico), o metanol rompe as ligações de hidrogénio entre lípidos e proteínas.

Para as amostras sólidas foram pesados cerca de 1 g de amostra e misturou-se com 20 mL de líquido Folch (clorofórmio (CHCl₃): Metanol (MeOH) (2:1, v/v) + 0,01%BHT) num tubo falcon. Após 15 min de agitação, foi adicionado 0,5 mL de metanol e as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 10 min. De seguida adicionou-se 1 mL de metanol e a solução foi filtrada com papel de filtro (Whatman) para um novo tubo falcon e com a fração sólida do primeiro tubo repete-se a extração. Após a repetição da extração, foram adicionados 8 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl 0,73%) e as amostras foram novamente agitadas e centrifugadas a 2500 rpm durante 15 min, de modo a separar o sistema bifásico. Com a ajuda de uma pipeta de Pasteur rejeitou-se a fase aquosa superior e transferiu-se a fase inferior para um tubo rotavapor, previamente pesado, onde se efetuou a evaporação dos solventes (CHCl₃ e MeOH) a 45 °C. O tubo com o resíduo obtido foi deixado num exsiccador por 24 h e posteriormente pesado (Folch, Lees, & Sloane Stanley, 1957).

A fração sólida das amostras que ficou retida no papel (sem conteúdo lipídico), foi mais tarde colocada a secar numa estufa a 100 °C para ser usada posteriormente na determinação de fibras insolúveis.

No caso das bebidas, foram medidos 25 mL de amostra e adicionado 20 mL de líquido Folch, de seguida as amostras foram agitadas e centrifugadas a 2500 rpm durante 15 min e descartou-se o sobrenadante com uma pipeta de Pasteur. Por fim, procedeu-se de igual forma às amostras sólidas, onde a fase remanescente que contém o conteúdo lipídico solúvel foi transferida para um tubo rotavapor, de forma a evaporar os solventes.

Na Figura 15 encontra-se uma demonstração da filtração efetuada e do conteúdo lipídico obtido.

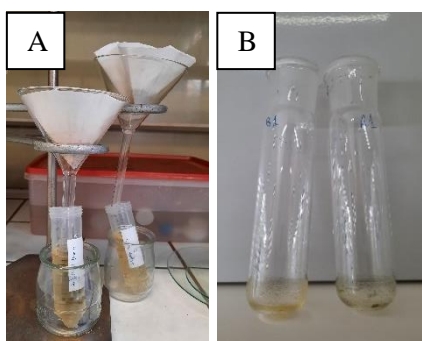


Figura 15. Extração dos lípidos: A) Filtração da solução contendo amostra; B) Tubo rotavapor com o conteúdo lipídico.

O cálculo do teor de lípidos, em base seca, foi realizado conforme a Equação 6.

$$\text{Teor de lípidos (\% lípidos/ g amostra)} = \frac{\text{massa}_{\text{lípidos}}}{\text{massa}_{\text{amostra}} \times \text{Coef. matéria seca}} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

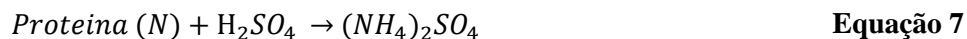
As análises foram realizadas em triplicado.

3.4.4. Proteínas

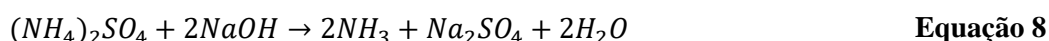
3.4.4.1. Proteínas totais nas amostras sólidas

O teor proteico das amostras sólidas (bolota, alfarroba, B30, A30 e A10) foi determinado pelo método Kjeldahl, através da quantificação do azoto total presente nas amostras em estudo. O conteúdo de proteínas nas amostras pode ser determinado com base no teor de azoto utilizando um fator de conversão que depende do tipo de amostra analisada. Este método envolve uma abordagem de três etapas para a quantificação de proteínas: digestão, destilação e titulação.

Na primeira etapa da digestão da amostra, o azoto orgânico é convertido em amónio (NH_4^+) (Equação 7). Esta digestão é efetuada a uma temperatura elevada, com ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), e na presença de um sal de sulfato para elevar o ponto de ebulição e de um catalisador (por exemplo, cobre, mercúrio ou selénio) para acelerar a reação (Evers & Hughes, 2002).



Após arrefecimento, na segunda etapa, a solução resultante da digestão é diluída com água e neutralizada pela adição de hidróxido de sódio (NaOH) que converte o amónio em amónia (NH_3) (Equação 8), que é destilado a vapor e recolhido numa solução de ácido bórico (H_3BO_3) em excesso contendo os indicadores vermelho de metilo e azul de metileno, formando assim o borato de amónio (H_2BO_3^-) (Equação 9) (Nielsen, 2010).



Na terceira etapa, o borato de amónio (proporcional à quantidade de azoto) é então titulado com um ácido padrão, normalmente ácido clorídrico (HCl), para estimar o teor total de azoto da amostra, onde o ponto de equivalência é detetado pela mudança de cor da solução verde para rosa acinzentado (Equação 10) (Nielsen, 2010).



Este método consistiu em três etapas distintas para a quantificação de proteínas: digestão, destilação e titulação (AOAC, 2000).

- **Digestão** – As amostras foram previamente pesadas (0,5-1 g) e de seguida digeridas num digestor de aquecimento DK6 (Velp Scientific, Usmate, Italy) (em cinco tubos digestores + um branco) juntamente com 12 mL de ácido sulfúrico 98% (H₂SO₄) e duas pastilhas de Kjeldahl (catalisador com 1,5% CuSO₄·5H₂O e 2% Se). A digestão foi executada em três fases, com temperaturas e períodos de tempo distintos: 1º- 180 °C/30 min; 2º- 250 °C/30 min; 3º- 420 °C/120 min.
- **Destilação** – Após arrefecimento até à temperatura ambiente das amostras digeridas, adicionou-se cuidadosamente para cada tubo digestor 75 mL de água desionizada e preparou-se seis matrizes com 25 mL de ácido bórico a 2% (H₃BO₃) juntamente com duas/três gotas do indicador vermelho de metilo e azul de metileno. Colocou-se os tubos de digestão com os respetivos matrizes numa unidade de destilação Keltec System 1002 (Foss Tecator, Hilleroed Dinamarca) e procedeu-se à destilação das amostras com a adição, por bombada, de 50 mL de hidróxido de sódio a 40% (NaOH) aos tubos de digestão para neutralização. Cada amostra ficou a destilar durante, aproximadamente, 4 min.
- **Titulação** – Nesta etapa procedeu-se à titulação da solução destilada de cada matraz com uma solução padrão de ácido clorídrico (HCl) 0,1 M, sendo que o ponto de equivalência foi detetado pela mudança de cor da solução verde para rosa acinzentado.

Na Figura 16 estão representados os equipamentos de digestão e de destilação utilizados nas duas primeiras etapas, assim como a demonstração do ponto de equivalência detetado na etapa da titulação.

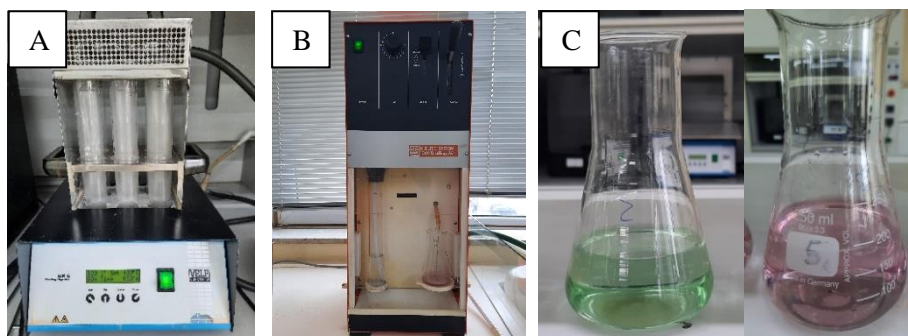


Figura 16. Método Kjeldahl: A) Digestor de aquecimento; B) Unidade de destilação; C) Ponto de equivalência da titulação

Para estimar o teor total de azoto da amostra, em base seca, recorreu-se à seguinte Equação 11.

$$\% \text{ Azoto (base seca)} = \frac{V \text{ gasto HCL} \times |\text{HCl}| \times 14,007}{\text{massa da amostra} \times \text{Matéria seca}} \quad \text{Equação 11}$$

Com o valor calculado do teor total de azoto nas amostras, o teor de proteína total foi calculado multiplicando o azoto orgânico por um fator de conversão (5,30 para a bolota e 6,25 para a alfarroba*), como demonstrado na Equação 12 (Greenfield & Southgate, 2003).

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Azoto} \times \text{fator de conversão}$$

Equação 12

As análises foram realizadas em duplicado.

**Nota:* Os fatores de conversão escolhidos basearam-se numa tabela de conversão de valores, onde foi escolhido a categoria “noz - outros” para a bolota e a de “feijão” para a alfarroba (Greenfield & Southgate, 2003).

3.4.4.2. Proteínas solúveis totais

As proteínas solúveis totais presentes em todas as amostras a analisar foram determinadas pelo método de Bradford. Este método é amplamente utilizado em análises bioquímicas para quantificação de proteínas e baseia-se na interação entre o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) e as proteínas, especificamente com aminoácidos aromáticos e básicos. A ligação do corante à proteína provoca uma mudança na absorção máxima do corante de 465 para 595 nm, e é o aumento da absorção a 595 nm que é monitorizado (Bradford, 1976).

A extração das proteínas das amostras sólidas foi realizada de acordo com Ferreras et al. (2021) com pequenas alterações. Cerca de 5 g de amostra foi misturada com 20 mL de tampão (0,125M tris-HCl [pH 7,4] com 50 mM NaCl) e extraída durante a noite com agitação constante. De seguida a mistura resultante foi centrifugada numa centrífuga (Megafuge™ 16 Centrifuge Series da ThermoFisher Scientific) durante 30 min a 4 °C a 8000xg e após a separação das camadas, o sobrenadante (fração que contém o extrato de proteína solúvel) foi recolhido e armazenado num frigorífico e o resíduo descartado (Ferreras et al., 2021). Para as bebidas não foi necessário efetuar qualquer extração, sendo que as amostras líquidas seguiram diretamente para determinação após centrifugação.

De seguida, efetuou-se a determinação das proteínas solúveis através do método de Bradford adaptado para um procedimento de microplaca de 96 poços, como esquematizado na Figura 17. Usou-se uma proporção de 1:10 entre padrão/amostra/branco e o reagente de Bradford, usando 20 µL + 200 µL de cada um, respetivamente (Bradford, 1976), sendo o branco constituído por cloreto de sódio (NaCl 99,9%). Foram realizadas as diluições necessárias às amostras com água ultrapura e todas as análises foram feitas em triplicado e medidas num leitor de microplacas por UV-Vis (Synergy HTX Multi-Mode Reader) utilizando o software Gen5 2.0 a 595nm.

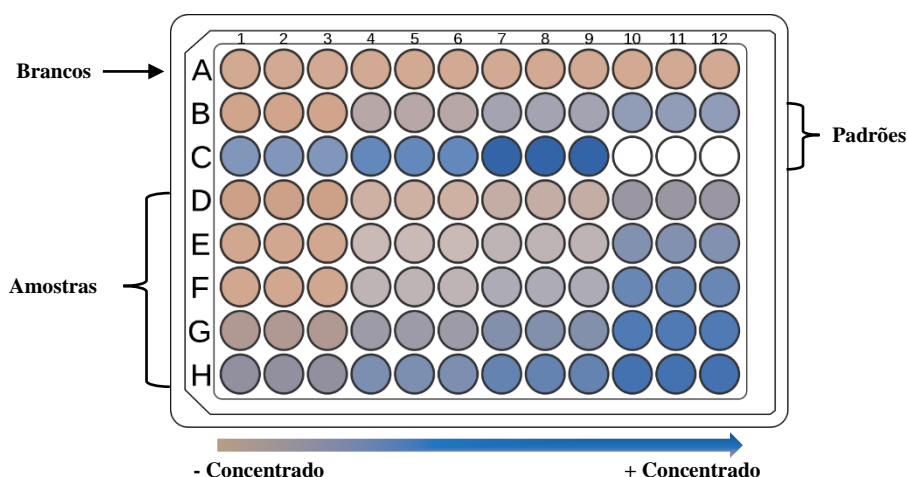


Figura 17. Representação esquemática das microplacas utilizadas para a determinação das proteínas solúveis. Legenda: Linha A – brancos; Linhas B e C – padrões (do menos concentrado ao mais concentrado); e Linhas D-H – amostras (menos concentradas (coluna 1) até às mais concentradas (coluna 12)).

Para a quantificação das proteínas solúveis, preparou-se uma curva de calibração ajustada por regressão linear (Anexo A), utilizando uma solução de BSA (albumina de soro bovino) 0,5 mg/ mL (do kit Bradford) como proteína padrão. Foram realizadas oito concentrações de padrão entre 0 e 0,5 mg / mL.

3.4.5. Extração de Compostos bioativos (compostos fenólicos, açúcares totais e taninos)

Para a determinação de alguns parâmetros como os açúcares totais, teor de fenólicos totais (TPC), teor de flavonoides totais (TFC), taninos condensados e também para a análise da bioatividade, foi realizada uma extração dos respetivos compostos bioativos a partir das amostras sólidas.

Como primeiro passo foi necessário extrair as gorduras das amostras sólidas: pesou-se cerca de 1 g de amostra e dissolveu-se em 20 mL de *n*-hexano (C_6H_{14}), de seguida homogeneizou-se a solução através de agitação num vortex por 2/3 min e por ultrassons durante 10 min, seguindo-se uma centrifugação a 9000 rpm durante 10 min. Após a separação das fases, descartou-se o sobrenadante e manteve-se o resíduo resultante (sem gordura).

Para a extração dos compostos bioativos de interesse procedeu-se à extração do resíduo obtido com uma solução de etanol (C_2H_5OH 80%), como previamente relatado por Soares et al. (2021) para a extração dos açúcares totais, e para a extração de compostos fenólicos e por Si et al. (2012) para a extração de taninos. Foi adicionado ao resíduo (sem gordura) 20 mL de uma solução etanólica (C_2H_5OH 80%), e após nova agitação no vortex durante 1 min, a solução foi colocada em banho-maria a 80 °C com agitação constante durante 15 min e por fim centrifugada a 9000 rpm durante 20 min. O sobrenadante obtido foi posteriormente utilizado para a determinação dos parâmetros já referidos anteriormente.

No caso das bebidas não foi necessário efetuar qualquer extração, sendo que foram analisadas diretamente após preparação.

3.4.6. Açúcares totais

O teor de açúcares totais foi determinado segundo o método fenol-sulfúrico, de acordo com Masuko et al. (2005). Este método fundamenta-se no facto de que os açúcares simples ou complexos, e seus derivados, quando tratados com fenol e ácido sulfúrico concentrado, originam compostos de coloração amarelo-alaranjado, mantendo esta coloração estável. Quanto maior a intensidade da cor, maior a concentração de açúcares, podendo esta concentração ser determinada por espectrofotometria, após a reação (Dubois et al., 1956).

A partir das soluções obtidas da extração dos compostos bioativos (seção anterior) e das bebidas, realizaram-se diluições usando etanol (C_2H_5OH 80%). Em cada eppendorf foi adicionado 100 μL padrão/amostra/branco, sendo o branco, água ultrapura, + 500 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 98%) + 100 μL de solução de fenol concentrado a 20% e para os brancos das amostras 100 μL de cada amostra diluída + 600 μL de água ultrapura. Após um tempo de incubação de 30 min à temperatura ambiente, foi feita a leitura dos resultados num leitor de microplacas (200 μL de cada solução em triplicado) por espectrofotometria de absorção molecular no UV-Vis a um comprimento de onda de 490 nm. Na Figura 18 está representado o esquema de aplicação das respetivas amostras a analisar na microplaca.

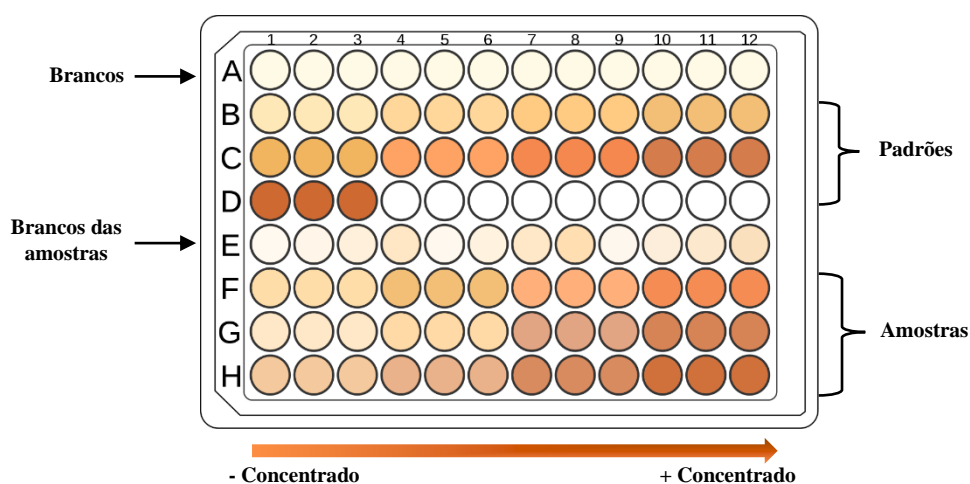


Figura 18. Representação esquemática das microplacas utilizadas para a determinação dos açúcares totais. Legenda: Linha A – brancos; Linhas B-D – padrões (do menos concentrado ao mais concentrado); Linha E – Brancos das amostras; Linhas F-H – amostras menos concentradas (coluna 1) até às mais concentradas (coluna 12).

Para a determinação do teor de açúcares totais, preparou-se uma curva de calibração, ajustada por regressão linear, utilizando uma solução padrão de glicose mono-hidratada 1mg/ mL, como demonstrado no Anexo B.

3.4.7. Fibras insolúveis

Para a determinação das fibras insolúveis usou-se o método do detergente ácido segundo Soest (1963), utilizando os extratos das amostras sólidas previamente desengordurados e secos (numa estufa a 100 °C) que ficaram retidos no papel de filtro após a extração dos lípidos totais. Relativamente às bebidas, foram colocados a secar cerca de 25 mL de amostra numa estufa a 100 °C durante 24 h de forma a obter um extrato sólido.

A digestão das amostras para quantificar as fibras insolúveis foi efetuada através de uma digestão a quente em refluxo utilizando um condensador de ar: num balão de destilação dissolveu-se cerca de 25 mL de uma solução CTAB em H₂SO₄ 0,5 M com cerca de 0,5 g de amostra e adicionou-se cerca de duas gotas de octanol (um agente anti espuma para evitar a produção excessiva de bolhas durante a reação). De seguida procedeu-se à extração durante 1 h com uma manta de aquecimento como fonte de calor e um condensador de ar devidamente encaixado no balão, como é possível ver na Figura 19.



Figura 19. Extração a quente em refluxo das fibras insolúveis.

Após a digestão, o resíduo obtido foi filtrado com papel de filtro previamente pesado para um matraz e lavado duas vezes com água ultrapura a ferver e de seguida com acetona até deixar de sair uma solução com cor, quebrando todos os aglomerados de modo que o solvente entre em contacto com todas as partículas de fibra. Por fim, secou-se o filtro numa estufa a 100 °C durante 30 min e deixou-se arrefecer num exsiccador até peso constante (Soest, 1963).

As análises efetuadas foram realizadas em triplicado e a percentagem de fibra insolúvel nas

$$\text{Teor de fibras (\% g fibras/ g amostra)} = \frac{\text{massa}_{\text{fibras}}}{\text{massa}_{\text{amostra}} \times \text{Coef. matéria seca}} \times 100 \quad \text{Equação 13}$$

amostras, em base seca, foi calculada conforme a Equação 13.

3.4.8. Minerais (Ca, K, Mg e Na)

Os minerais Cálcio (Ca), Potássio (K), Magnésio (Mg) e Sódio (Na) foram determinados por absorção atómica com atomização por chama num espectrómetro de absorção atómica de chama de alta resolução com fonte contínua (ContrAA® 700, Analytikjena, Jena, Alemanha) de acordo com Soares et al. (2020). O conteúdo mineral foi analisado após adição cerca de 1 mL de ácido nítrico (HNO₃) às cinzas das amostras, e transferiu-se a solução resultante para um balão volumétrico de 50 mL completo com água ultrapura.

Para a determinação destes macronutrientes no espectrómetro, amostras e padrões foram preparados com solução 1% em HNO₃ com 0,1% CsCl como tampão de ionização para K, Mg e Na, enquanto a solução para o Ca foi preparada com 1% CsCl. Neste sentido, foram traçadas curvas de calibração pela leitura de soluções padrão, a partir de uma solução mãe de 10 mg / L de cada mineral como representado no Anexo C. Todas as análises foram realizadas em triplicado e o comprimento de

onda do espectrómetro foi fixado em 422,7 nm para Ca, 589,6 nm para Na, 766,5 nm para K e 285,2 nm para Mg.

Além da determinação da concentração destes minerais, foi também calculado o rácio Na/K e o rácio Ca/Mg, assim como o teor de sal para todas as amostras segundo o Regulamento (EU) n.o 1169/2011 de 25 de outubro de 2011 pela seguinte equação 14.

$$\text{Teor de Sal (\% g/100 g)} = \text{Na (\%)} \times 2,5 \quad \text{Equação 14}$$

3.4.9. Valor energético

Para a determinação do valor energético das bebidas produzidas, foi seguido o disposto no regulamento (EU) n.o 1169/2011 de 25 de outubro de 2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, pela Equação 15.

$$\text{Valor energético } \left(\frac{\text{Kcal}}{100 \text{ g}} \right) = \text{Hidratos de carbono } \left(\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right) \times 4 \frac{\text{kcal}}{\text{g}} + \text{Proteínas } \left(\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right) \times 4 \frac{\text{kcal}}{\text{g}} + \text{Lípidos } \left(\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right) \times 9 \frac{\text{kcal}}{\text{g}}$$

$$\text{Equação 15}$$

3.5. Avaliação da atividade antioxidante

De forma a avaliar a capacidade antioxidante das matrizes (bolota e alfarroba), das respetivas torradas utilizadas no produto final (B30, A30 e A10) e das bebidas (B1, B2, B3, CF e CEV) foram analisados: i) Compostos fenólicos dos quais – teor de fenólicos totais (TPC), teor de flavonoides totais (TFC) e taninos condensados; ii) pH e produtos da reação de *Maillard*; e iii) Quantificação da atividade antioxidante pelos métodos de sequestro dos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•].

3.5.1. Compostos fenólicos

Para as seguintes análises, foram utilizadas as soluções obtidas da extração de compostos fenólicos nas amostras sólidas, referido na secção 3.4.5, e as bebidas preparadas.

3.5.1.1. Teor de fenólicos totais (TPC)

O conteúdo fenólico total (TPC) das amostras foi medido através de um ensaio colorimétrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Este é um método espectrofotométrico que avalia, em meio alcalino, a quantidade total de compostos presentes nos extratos com capacidade redutora, através da formação de um complexo azul estável no final da reação. Este complexo corado tem uma absorvância máxima na região de 765 nm, sendo esta proporcional à quantidade total de compostos fenólicos ou redutores originalmente presentes (Ahmed & Iqbal, 2018).

Esta análise foi realizada de acordo com Barroso et al. (2016) numa microplaca de 96 poços, nos quais foi adicionado 25 µL de padrão/amostra/branco + 75 µL de água ultrapura e 25 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (mistura de reagente Folin-Ciocalteu com água 1:1) em todos os poços, sendo o branco constituído por água ultrapura. Após um repouso de 6 min ao abrigo da luz adicionou-se 100 µL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) e deixou-se repousar novamente durante 90 min ao abrigo da luz.

No final desse período, os resultados foram lidos num leitor de microplacas a 765 nm. Na Figura 20 encontra-se uma representação do esquema da microplaca usada para esta determinação.

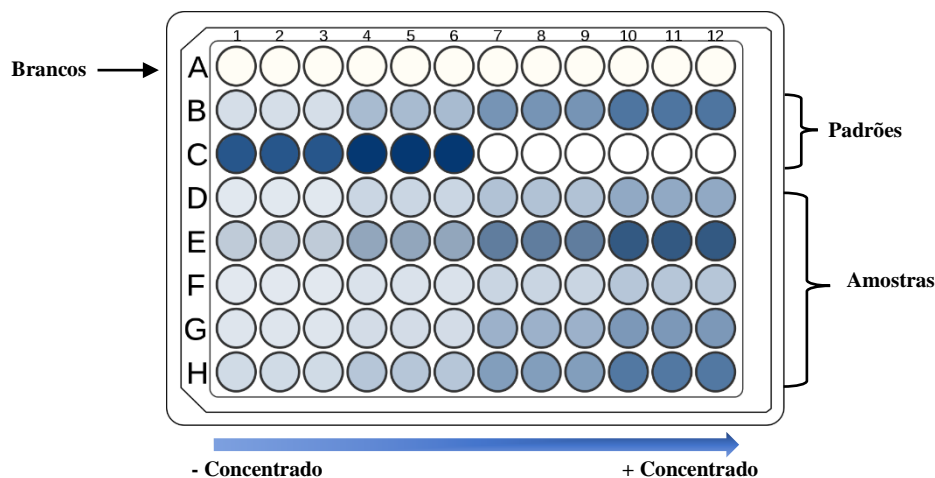


Figura 20. Representação esquemática das microplacas usadas para a determinação do TPC. Legenda: Linha A – brancos; Linha B e C – padrões (do menos concentrado ao mais concentrado); Linha D-H – amostras menos concentradas (coluna 1) até às mais concentradas (coluna 12).

A quantificação do teor de fenólicos totais foi realizada num leitor de microplacas por UV-Vis, usando uma solução de ácido gálgico como padrão com uma concentração de 200 mg / L, guardada ao abrigo da luz. A partir dessa solução foram preparadas sete concentrações de padrão entre 0 e 200 mg / L, com água ultrapura e foi construído uma curva de calibração como apresentado no Anexo E.1. As análises foram efetuadas em triplicado e os resultados obtidos foram expressos em equivalentes de ácido gálgico (mg EAG/g extrato seco).

3.5.1.2. Teor de flavonoides totais (TFC)

O teor de flavonoides totais (TFC) nas amostras foi determinado por um ensaio colorimétrico com o cloreto de alumínio (AlCl_3). Esta técnica baseia-se na formação de um complexo estável derivado da reação de complexação entre o ião de alumínio (Al^{3+}) com as moléculas de flavonoides da amostra, produzindo uma coloração cor-de-rosa, lida a 510 nm, cuja intensidade é proporcional à concentração de flavonoide presente na amostra (Ahmed & Iqbal, 2018).

Os compostos flavonoides totais foram determinados conforme a metodologia descrita por Soares et al. (2021). Numa microplaca de 96 poços foi adicionado 25 μL de padrão/amostra/branco + 100 μL de água ultrapura e 10 μL de nitrito de sódio (NaNO_2 5%) em todos os poços, sendo o branco constituído por água ultrapura, e para os brancos das amostras 25 μL de cada amostra diluída + 175 μL de água ultrapura. Após 5 min em repouso e ao abrigo da luz adicionou-se 15 μL de AlCl_3 (100g/L), depois repousou-se novamente a microplaca durante 6 min e por fim adicionou-se 50 μL de NaOH (1M). Por último, a microplaca foi incubada em agitação suave durante 10 min e os resultados lidos num leitor de microplacas a 510 nm.

Na Figura 21 encontra-se uma representação esquemática da microplaca de 96 poços usada para este ensaio.

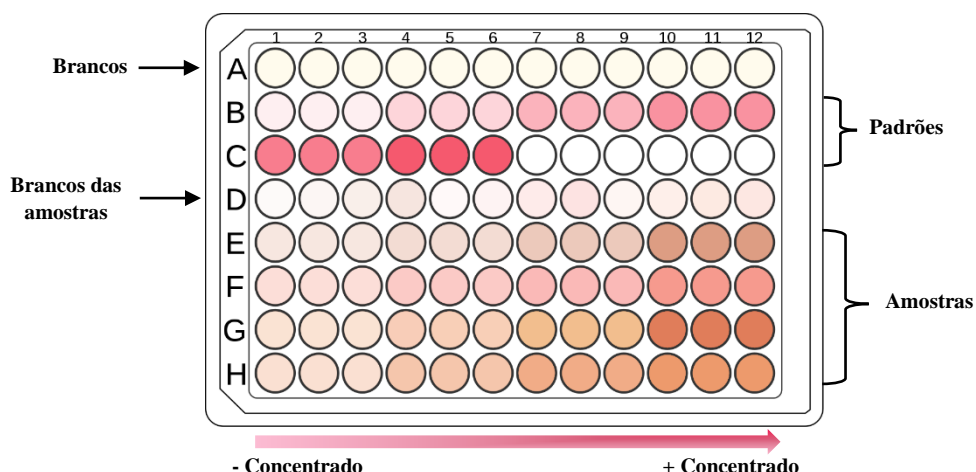


Figura 21. Representação esquemática das microplacas usadas para a determinação do TFC. Legenda: Linha A – brancos; Linha B e C – padrões (do menos concentrado ao mais concentrado); Linha D – brancos das amostras; Linhas E-H – amostras menos concentradas (coluna 1) até às mais concentradas (coluna 12).

A quantificação do teor de flavonoides totais foi realizada num leitor de microplacas por UV-Vis, usando como padrão uma solução de epicatequina com uma concentração de 300 mg/L. Foram preparadas sete concentrações padrão entre 0 a 300 mg/L, com água ultrapura e foi construído uma curva de calibração (Anexo E.2). As análises foram lidas em triplicado e os resultados obtidos foram expressos em equivalentes de epicatequina (mg EEC/g extrato seco).

3.5.1.3. Taninos condensados

A determinação dos taninos condensados foi efetuada através do método descrito por Herald et al. (2014), com algumas modificações. Para esta análise, as amostras foram diluídas com água ultrapura e misturadas com vanilina dissolvida em H_2SO_4 . Na Figura 22 encontra-se uma representação das microplacas de 96 poços usadas, sendo que a cada poço da microplaca foi adicionado 200 μL de etanol (C_2H_5OH 99,9%) para o branco, 80 μL de padrão/amostra + 40 μL de etanol + 80 μL de reagente de vanilina (1% vanilina + ácido sulfúrico (H_2SO_4 70%)) e para os brancos das amostras 80 μL de cada amostra diluída + 120 μL de etanol. Após um período de incubação de 30 min à temperatura ambiente efetuou-se a leitura dos resultados no leitor de microplacas por UV-Vis a 500 nm.

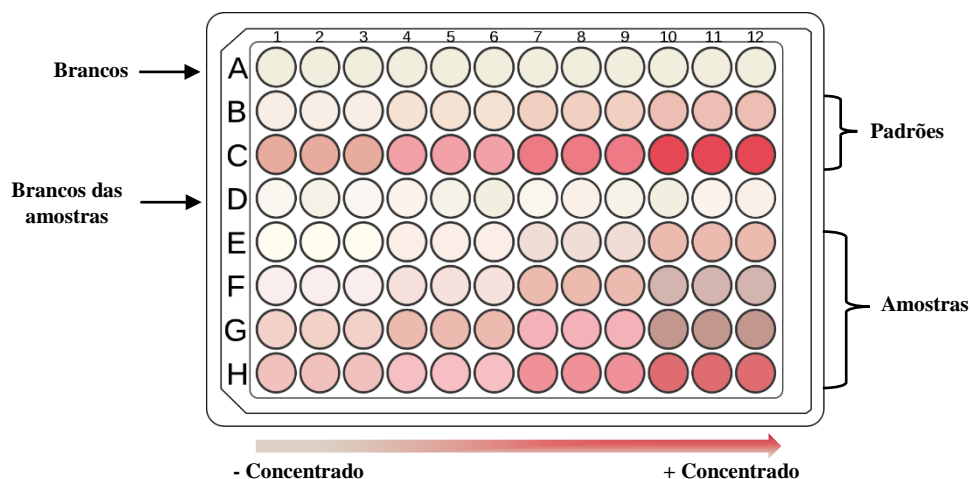


Figura 22. Representação esquemática das microplacas usadas para a determinação dos taninos condensados. Legenda: Linha A – brancos; Linha B e C – padrões (do menos concentrado ao mais concentrado); Linha D – brancos das amostras; Linhas E-H – amostras menos concentradas (coluna 1) até às mais concentradas (coluna 12).

Todas as análises efetuadas foram realizadas em triplicado e para a construção da curva de calibração foram preparadas diversas concentrações a partir de uma solução padrão de catequina 100 mg/L, como representado no Anexo D.

3.5.2. pH e Produtos da reação de Maillard

Para efetuar a medição do pH e também a análise dos produtos da reação de *Maillard* que ocorre durante a torra das amostras sólidas, preparou-se uma solução aquosa de cada amostra torrada de forma a potenciar a extração dos compostos de *Maillard* e o aparecimento de cor. Inicialmente, diluiu-se cerca de 1g de cada amostra em 20 mL de água ultrapura, agitou-se a mistura num vortex e colocou-se num frigorífico (cerca de 4 °C) durante dois dias para uma melhor dissolução (Budryn et al, 2009). Após esse período, transferiu-se a mistura para um banho-maria a 80 °C durante 15 min, agitou-se novamente e centrifugou-se a 9000 rpm durante 20 min, de modo a separar os resíduos sólidos da solução. O sobrenadante obtido foi assim utilizado para a realização de ambas as análises (Figura 23).

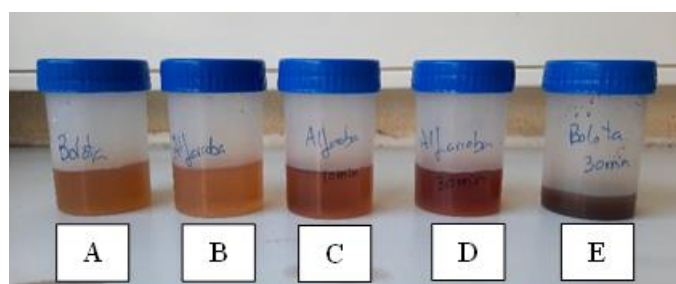


Figura 23. Soluções preparadas das amostras sólidas para medição de pH e para a determinação dos produtos da reação de *Maillard*: A – Bolota; B – Alfarroba; C – A10; D – A30; E – B30.

Os valores de pH foram medidos, em triplicado, com um medidor de pH (pH-meter Model Crison micro pH 2000, Barcelona, Espanha), mergulhando o eléctrodo diretamente nas soluções preparadas e nas amostras líquidas.

Relativamente aos produtos formados na reação de *Maillard*, foi efetuada uma análise dos mesmos num leitor de microplacas conforme descrito por Soares et al. (2021). O índice de acastanhamento (Br, do inglês *Browning Index*), uma medida que avalia em termos visuais o nível de escurecimento das amostras, foi medido a 294, 360, e 420 nm e o composto hidroximetilfurfural a 280 nm. As análises foram realizadas em duplicado e quando necessário, as amostras foram diluídas de forma a obter um valor de absorvância inferior a 1,5. Os resultados foram expressos em unidades de absorvância (AU).

A formação dos produtos de glicação avançada (AGEs, do inglês *Advanced Glycation Endproducts*) foi estimada medindo a fluorescência a um comprimento de onda de excitação de 360 ± 40 nm e um comprimento de onda de emissão de 460 ± 40 nm. Os resultados foram expressos em unidades de fluorescência (FU).

A leitura dos resultados foi realizada numa microplaca de 96 poços, na qual se aplicou 220 μ L de água ultrapura nos brancos e 220 μ L de uma série de diluições de cada amostra, em duplicado, conforme representado no esquema da Figura 24.

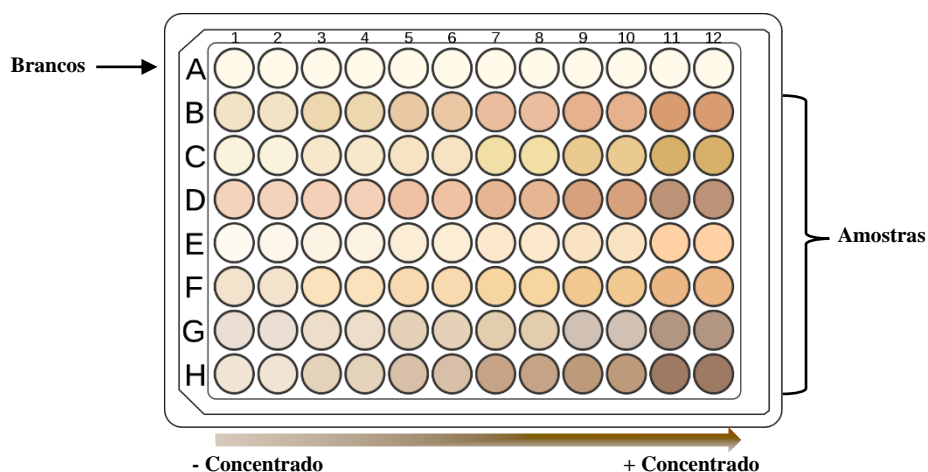


Figura 24. Representação esquemática das microplacas utilizadas para a determinação dos produtos da reação de *Maillard*.
Legenda: Linha A – brancos (H_2O ultrapura); Linhas B e H – amostras (menos concentradas (coluna 1) até às mais concentradas (coluna 12)).

Os parâmetros de cor de amarelo a castanho-amarelado foram calculados como reportado por Soares et al. (2021). Estes parâmetros foram utilizados para obter valores de X, Y e Z, de acordo com as Equações 16, 17 e 18, onde T_{625} , T_{495} , T_{445} e T_{550} são os valores da transmitância a 625, 495, 445 e 550 nm respetivamente, medidos num leitor de microplacas.

$$X = T_{625} \times 0.42 + T_{550} \times 0.35 + T_{445} \times 0.21 \quad \text{Equação 16}$$

$$Y = T_{625} \times 0.2 + T_{550} \times 0.63 + T_{445} \times 0.17 \quad \text{Equação 17}$$

$$Z = T_{495} \times 0.24 + T_{445} \times 0.94 \quad \text{Equação 18}$$

O Br foi calculado de acordo com a Equação 19.

$$Br = 100 \times \frac{(x-0.31)}{0.172}, \text{ onde } x = \frac{X}{X+Y+Z} \quad \text{Equação 19}$$

Todas as leituras efetuadas foram realizadas em duplicado.

3.5.3. Método de sequestro de DPPH*

A captação ou sequestro de radicais é o principal mecanismo de ação dos antioxidantes nos alimentos. Existem diversas técnicas utilizadas para detetar a presença de compostos antioxidantes em que os radicais mais usados são o DPPH* (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e o ABTS⁺ (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-acidosulfónico).

No método DPPH, a capacidade de redução dos antioxidantes em relação ao radical pode ser avaliada através da monitorização da diminuição da sua absorvância a 517 nm. Quando uma solução de DPPH é misturada com um composto antioxidante, ocorre uma reação de oxirredução, onde o antioxidante fornece um átomo de hidrogénio ao eletrão desemparelhado do radical DPPH*, propiciando assim uma mudança de coloração na solução, de violeta para amarelo-claro (Xiao et al., 2020).

Para a realização deste método foi preparado o reagente DPPH* de concentração 0,1 mmol/L em etanol, mantendo-se sempre a solução abrigada da luz. O ensaio foi realizado numa microplaca de 96 poços, nos quais foram adicionados 25 µL de padrão/amostra + 200 µL de DPPH* e 225 µL de DPPH* no controlo negativo. A mistura, vigorosamente agitada, foi incubada durante 30 min no escuro (até valores de absorção estáveis) e posteriormente lida a 517 nm num leitor de microplacas.

Os resultados obtidos foram equiparados a um antioxidante sintético, o Trolox, usado como solução padrão para a realização da curva de calibração apresentada no Anexo F.1. Desta forma foram preparados padrões entre 10 e 100 mg/ mL com água ultrapura, a partir de uma concentração de 100 mg/ L de Trolox em solução etanólica.

Na Figura 25 está representado um esquema dos ensaios efetuados nas microplacas, onde é possível observar que durante a reação, a intensidade da cor diminui com o aumento das concentrações

do Trolox e das amostras, ou seja, quanto maior for a quantidade de radicais livres reduzidos pelo antioxidante presente nas soluções, menor é a absorvância medida.

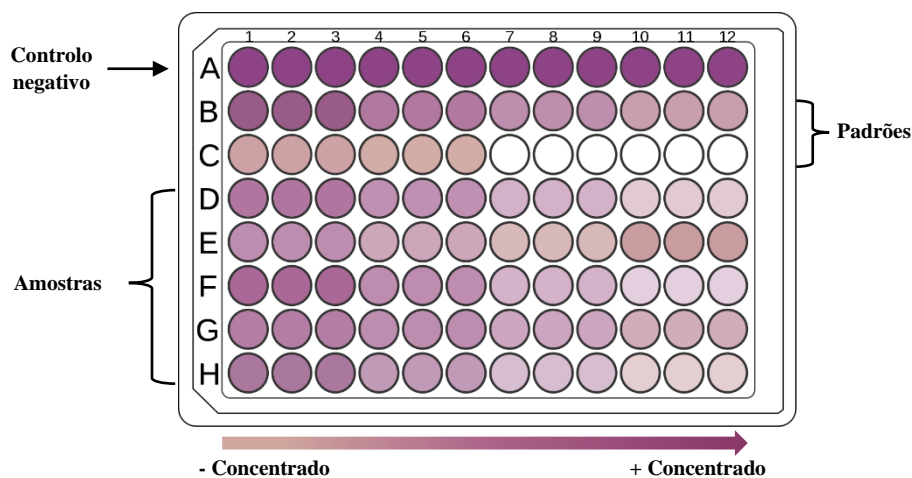


Figura 25. Representação esquemática das microplacas utilizadas para o método DPPH. Legenda: Linha A – Controlo negativo (não tem amostra); Linhas B e C – padrões (do menos concentrado ao mais concentrado); Linhas D-H – amostras (menos concentradas (coluna 1) até às mais concentradas (coluna 12)).

As análises foram realizadas em triplicado e os resultados obtidos foram expressos em equivalentes de Trolox (mg ET/ g extrato seco) e em termos de IC_{50} (concentração que inibe 50 % do radical), sendo que a percentagem de sequestro do radical DPPH* foi calculada através da Equação 20.

$$\% \text{ Inibição captação do radical} = \frac{\text{Abs do controlo} - \text{Abs do padrão/amostra}}{\text{Abs do controlo}} \times 100 \quad \text{Equação 20}$$

3.5.4. Método de sequestro de ABTS^{•+}

O método ABTS, baseia-se na capacidade dos compostos antioxidantes em capturar o radical ABTS^{•+}, quando colocados em contacto com o mesmo, provocando uma diminuição na absorvância, que pode ser lida a 734 nm. A adição de substâncias com poder antioxidante ao radical ABTS^{•+} provoca deste modo uma alteração estrutural que se traduz na descoloração da solução original azul-esverdeada (Xiao et al., 2020).

Para a realização deste método foi necessário preparar uma mistura de uma solução aquosa de ABTS^{•+} de concentração 7 mM com uma solução aquosa de persulfato de potássio (K₂O₈S₂) a 2,45 mM, tendo sido posteriormente armazenada à temperatura ambiente, protegida da luz, durante 16 h até a sua utilização. Após esse período, foi preparada uma solução de ABTS^{•+} diluída, com valores de absorvância compreendidos entre 0,680 – 0,720 nm, sendo posteriormente usada na execução do ensaio.

Numa microplaca de 96 poços foi adicionado 200 µL de etanol para o branco, 20 µL de padrão/amostra + 180 µL de ABTS^{•+} e para os brancos das amostras 20 µL de amostra diluída + 180

μL de água ultrapura. Após um período de incubação de 6 min ao abrigo da luz, os resultados foram lidos a 734 nm num leitor de microplacas.

Tal como no método do DPPH, foi utilizado o Trolox como padrão para este ensaio com uma concentração de 100 mg/ L, efetuando-se uma curva de calibração com diversos padrões entre 0,005 e 0,1 mg/ mL (Anexo F.2). O esquema dos ensaios efetuados nas microplacas está representado na Figura 26, onde se verifica que quanto maior for a concentração de antioxidantes presente nas soluções, menor é a absorvância medida e vai-se perdendo a cor azul-esverdeada do ABTS.

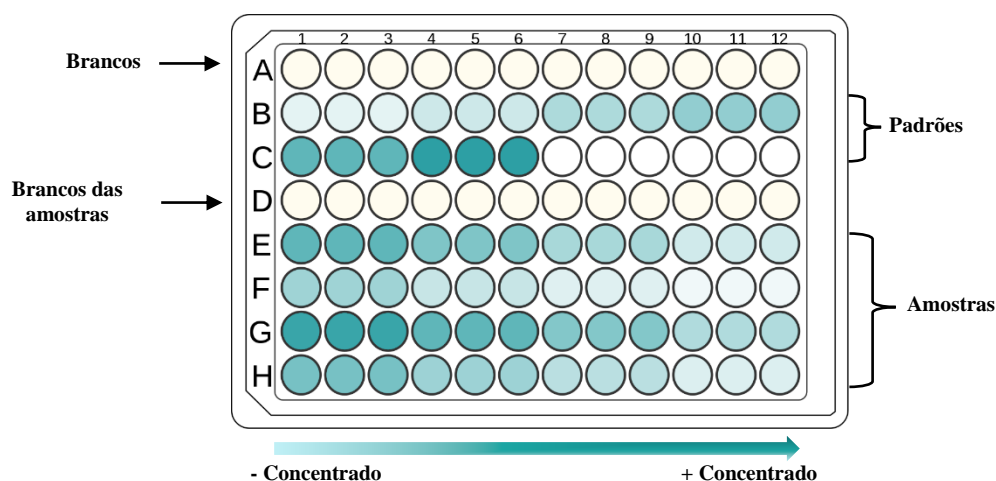


Figura 26. Representação esquemática das microplacas utilizadas para o método ABTS. Legenda: Linha A – Branco; Linhas B e C – padrões (do menos concentrado ao mais concentrado); Linha D – branco das amostras; Linhas E-H – amostras (menos concentradas (coluna 1) até às mais concentradas (coluna 12)).

Todas as análises foram efetuadas em triplicado e os resultados obtidos foram expressos em equivalentes de Trolox (mg ET/ g extrato seco) e em termos de IC_{50} , calculado através da Equação 20.

3.6. Análise da bioatividade

A atividade inibitória enzimática dos extratos das amostras sólidas e das bebidas foi avaliada usando as enzimas α -glucosidase e α -amilase através de ensaios enzimáticos monitorizados por espectrofotometria de absorção molecular no UV-Vis. Estas enzimas são fundamentais na digestão dos hidratos de carbono, sendo que tem sido cada vez mais procurados compostos naturais que inibam a ação destas enzimas, tornando-se importantes no tratamento da diabetes.

3.6.1. Ensaio de inibição da α -Glucosidase

A atividade inibitória da enzima α -glucosidase pode ser avaliada por um ensaio colorimétrico que determina a atividade enzimática da enzima e o efeito dos inibidores sobre a mesma. O seu princípio baseia-se na degradação do substrato 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosido pela α -glucosidase formando *p*-nitrofenol, um composto amarelo que é libertado em conjunto com uma molécula de glucose conforme demonstrado na Figura 27 (Eertmans et al., 2014).

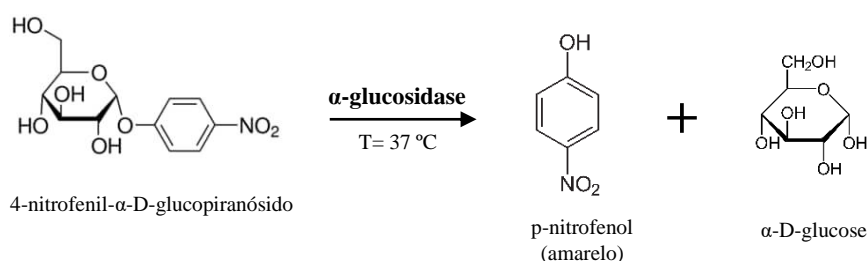


Figura 27. Reação de conversão de 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosido em p-nitrofenol e glucose. Adaptado de Louro (2014).

O ensaio de inibição da α -glucosidase foi realizado adaptando o método descrito por Vinholes et al. (2011) e por Lordan et al. (2013), com algumas modificações. Foram preparadas diversas soluções, nomeadamente uma solução tampão de fosfato de potássio de 10 mM ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7), uma solução de substrato 2,5 mM (4-nitrofenil- α -D-glucopiranosido), uma solução de enzima α -glucosidase 0,35 U/ mL e uma solução de acarbose (controlo positivo) de 12 mg/ mL, todas diluídas em tampão. Efetuaram-se também diluições em série da acarbose e dos extratos preparados das amostras, sendo que foram testadas concentrações no poço que variaram entre 2 e 0,0313 mg/ mL para as amostras de alfarroba, A30, A10, CF e CEV, entre 1 e 0,0156 mg/ mL para as bebidas B1, B2, B3 e 0,0625 e 0,00391 mg/ mL para a bolota e B30.

O ensaio realizou-se a condições específicas de temperatura a 37 °C e a mistura da reação nas microplacas foi executada como demonstrado na Figura 28, onde se adicionou 50 μL de amostra nas linhas A a G e 50 μL na linha H (controlo negativo). Posteriormente, foi adicionado 130 μL de tampão + 100 μL de substrato em todos os poços e 20 μL de enzima em todos menos nas colunas 4,8 e 12, sendo substituído por 20 μL de tampão (brancos das amostras e do controlo negativo).

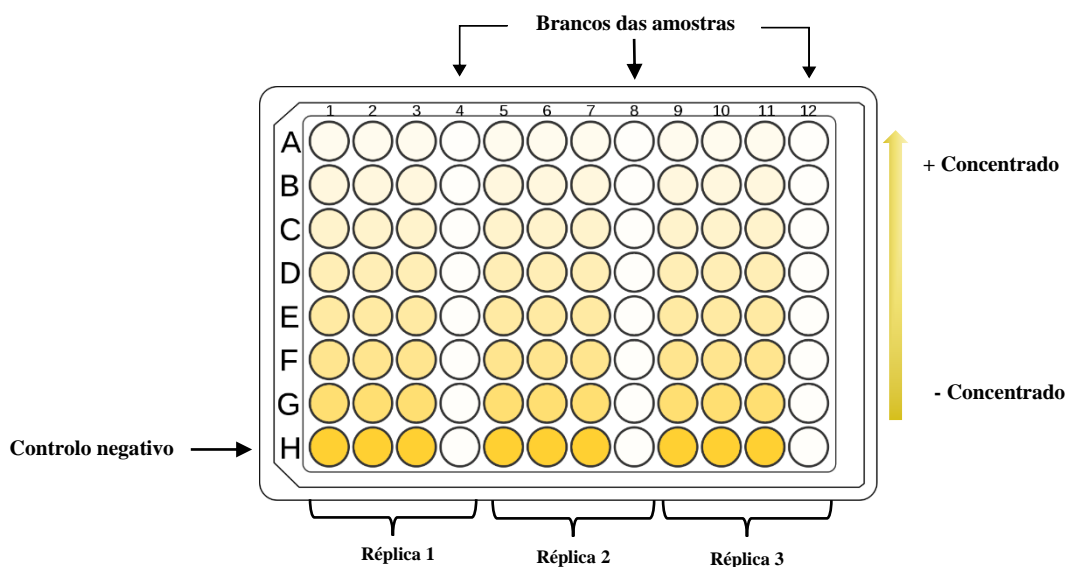


Figura 28. Representação esquemática das microplacas utilizadas para os ensaios de inibição da α -glucosidase. Legenda: Linha H – controlo negativo (sem amostra); Linhas A-G – amostra em triplicado (mais concentradas (linha A) até à menos concentradas (linha G)).

A absorvância foi lida a 405 nm durante 10 min (de 2 em 2 min) a 37 °C e mantida a absorvância do controlo negativo por volta de 0,07. Os resultados do estudo da cinética da atividade enzimática da enzima foram calculados segundo a Equação 21 e a concentração de extrato necessário para inibir 50% da atividade da enzima (IC₅₀) foi obtida utilizando o programa GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc., São Diego, Califórnia, Estados Unidos da América). Foram realizados ensaios em triplicado e os valores de IC₅₀ calculados, utilizando cinco a sete concentrações para cada amostra.

$$\% \text{ Atividade} = \frac{\text{Declive do controlo negativo} - \text{Declive amostra}}{\text{Declive do controlo negativo}} \times 100 \quad \text{Equação 21}$$

3.6.2. Ensaio de inibição da α -Amilase

A atividade da α -amilase é medida utilizando um método colorimétrico com um agente colorante DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) de cor amarela. Neste método, a enzima converte o amido (substrato) em maltose que é posteriormente misturada com uma solução de DNS, causando a mudança de cor deste de amarelo para um vermelho-alaranjado. Neste sentido, ocorre uma reação de oxirredução, catalisada pelo calor, entre a maltose e o DNS, onde os grupos aldeídos ou cetonas livres do açúcar redutor (maltose) permitem à molécula reduzir o reagente DNS, formando no fim da reação ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (vermelho-alaranjado). O esquema desta reação está demonstrado na Figura 29.

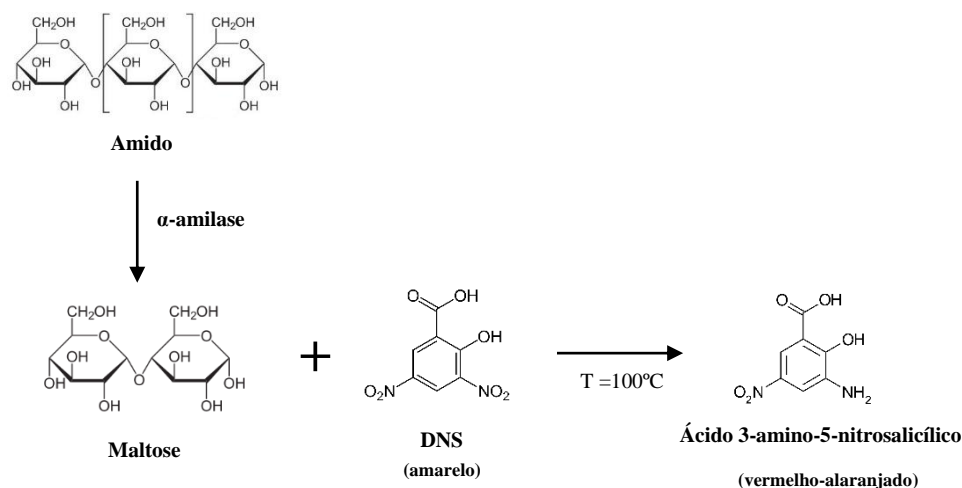


Figura 29. Esquema da reação da conversão do amido em maltose e redução do DNS. Adaptado de Dangkulwanich et al. (2018)

Para a avaliação da ação inibitória das amostras foi realizado um ensaio enzimático acoplado para a deteção colorimétrica da atividade de uma enzima α -amilase (enzima pancreática de porco) sobre os extratos preparados, adaptado do método previamente descrito por Lordan et al. (2013). Com isto, foi

preparada uma solução tampão de fosfato de sódio 20 mM (Na_3PO_4 , pH 6,9), uma solução de amido a 1%, uma solução de reagente de cor com DNS, uma solução de enzima α -amilase 0,5 mg/ mL e uma solução de acarbose de 25 mg/ mL, como controlo positivo. Foram realizadas diluições em série tanto da acarbose como dos extratos preparados das amostras, sendo que foram testadas ao todo cinco concentrações no poço entre intervalos de 1 a 0,0625 mg/ mL.

O ensaio foi executado em duas etapas, a primeira consistiu na mistura dos reagentes em tubos de vidro, de forma a facilitar o procedimento de fervura, e a segunda em transferir as soluções para uma microplaca de 96 poços para posterior leitura das absorvâncias. Na primeira etapa, foi adicionado aos tubos de vidro 100 μL de extrato (ou tampão, no caso do controlo negativo) + 100 μL de amido, deixou-se reagir durante 10 min à temperatura ambiente e de seguida adicionou-se 100 μL de solução de enzima (ou 100 μL de tampão, no caso dos brancos da amostra e do branco do controlo) e deixou-se reagir novamente esta mistura por 10 min à temperatura ambiente. Passado esse período adicionou-se 200 μL do reagente colorante com DNS em todos os tubos e levou-se à fervura (100 °C) num banho-maria durante 5 min. Após arrefecimento das soluções contidas nos tubos, procedeu-se ao preenchimento da microplaca com 50 μL de cada amostra + 200 μL de água ultrapura e efetuou-se a leitura a 540 nm num leitor de microplacas, sendo a absorvância ideal do controlo negativo entre 0,8-1,3.

Na Figura 30 encontra-se uma representação do esquema das microplacas efetuadas para este ensaio.

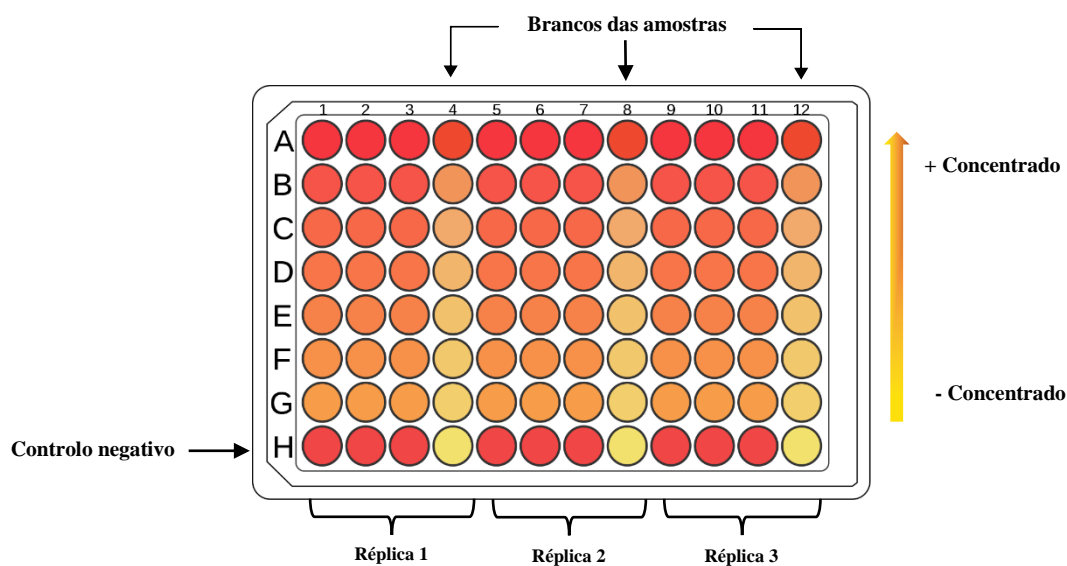


Figura 30. Representação esquemática das microplacas utilizadas para os ensaios de inibição da α -amilase. Legenda: Linha H – controlo negativo (sem amostra); Linhas A-G – amostra em triplicado (mais concentradas (linha A) até à menos concentradas (linha G)).

Todas as análises foram realizadas em triplicado e através das absorvâncias medidas foi calculada a atividade da enzima, de acordo com a Equação 18 representada na seção anterior, e os respetivos valores de IC_{50} através do programa GraphPad Prism 8.

3.7. Análise sensorial

Para a análise sensorial deste projeto foram apresentadas as bebidas preparadas B1, B2 e B3 a um grupo de provadores informais e aleatórios, com o objetivo principal de avaliar características organolépticas das bebidas como a aparência, o aroma e o sabor. Desta forma, os participantes preencheram um inquérito com algumas questões importantes para a análise, tendo sido realizado de forma anónima.

As bebidas foram dadas a provar aos provadores de forma aleatória sem dar a conhecer qualquer tipo de ingrediente da bebida, sendo que esta prova contou com cerca de 20 pessoas do sexo feminino e masculino de faixas etárias entre os 20 anos e os 50 anos de idade.

O inquérito foi realizado recorrendo à ferramenta Google Forms.

3.8. Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelos testes de Kolmogorov–Smirnov e Shapiro–Wilk. Os valores das determinações foram representados como média \pm desvio padrão e as comparações entre os grupos foram feitas por análise de variância simples (*one-way* ANOVA) com teste de múltiplas comparações Tukey, com nível de significância de $p < 0,05$. O estudo das correlações foi realizado recorrendo a matrizes de correlação de Pearson, com o intuito de explorar as associações entre a composição química das amostras e bioatividade. Para a análise dos dados obtidos utilizou-se a convenção apontada por Akoglu (2018). Assim, para um valor r de 0 não há correlação, valores de $\pm 0,10$ a $\pm 0,30$ são indicadores de uma correlação fraca; entre $\pm 0,40$ e $\pm 0,60$ de uma correlação moderada; entre $\pm 0,70$ e $\pm 0,90$ de uma correlação forte e ± 1 representa uma correlação perfeita. O programa de software GraphPad Prism 8) foi usado para realizar as análises estatísticas.

Relativamente à análise sensorial e como anteriormente referido os questionários foram distribuídos e recolhidos via digital. O tratamento estatístico dos dados foi efetuado através do teste alfa de Cronbach (Anexo H) e a comparação entre os grupos foi feita através de uma análise de variâncias (ANOVA) com um grau de significância de 0,05 com recurso ao programa IBMS SPSS para Windows, versão 26 (IBM Corp., Armonk, N.Y., EUA).

4. Resultados e Discussão

4.1. Composição química e nutricional

Os resultados referentes à composição química e nutricional das amostras sólidas de bolota e alfarroba (matrizes, B30, A30 e A10) e das bebidas funcionais desenvolvidas encontram-se representados nas Tabelas 8 e 9, respetivamente. Em ambas as tabelas estão reportados os valores do teor de humidade, cinzas, lípidos totais, proteínas totais e solúveis, açúcares totais e fibras insolúveis.

Tabela 8. Resultados obtidos para a composição química e nutricional das amostras sólidas.

Parâmetros	Resultados obtidos (% g/100 g)				
	Bolota	B30	Alfarroba	A30	A10
Humidade	9,16 ± 0,07 ^a	1,83 ± 0,16 ^b	11,4 ± 1,0 ^c	7,36 ± 0,21 ^d	7,70 ± 0,61 ^d
Cinzas	1,81 ± 0,11 ^a	1,90 ± 0,11 ^a	3,25 ± 0,21 ^b	3,54 ± 0,13 ^b	3,44 ± 0,12 ^b
Lípidos totais	4,77 ± 0,20 ^a	5,16 ± 0,17 ^a	1,74 ± 0,04 ^b	2,14 ± 0,07 ^b	2,04 ± 0,10 ^b
Proteínas					
Totais	3,69 ± 0,01 ^a	3,82 ± 0,11 ^a	2,62 ± 0,01 ^b	3,01 ± 0,04 ^c	2,68 ± 0,01 ^b
Solúveis	0,126 ± 0,007 ^a	0,0762 ± 0,0300 ^b	0,0510 ± 0,0004 ^b	0,0674 ± 0,0010 ^b	0,0688 ± 0,013 ^b
Açúcares totais	5,42 ± 0,52 ^a	3,23 ± 0,25 ^b	24,8 ± 0,5 ^c	9,48 ± 0,12 ^d	16,7 ± 0,1 ^e
Fibras insolúveis	19,0 ± 2,5 ^{ac}	17,5 ± 1,8 ^a	31,3 ± 4,0 ^{b,d}	43,8 ± 2,4 ^b	29,7 ± 3,2 ^{c,d}

Nota: Os valores são apresentados como média ± desvio padrão, em base seca (%). Em cada linha, letras diferentes superiores à linha correspondem a diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

O teor de humidade é um dos parâmetros mais frequentemente determinados para analisar a composição química de uma matriz. Através dos resultados apresentados na Tabela 8 verifica-se que a bolota contém um teor de humidade significativamente mais baixo relativamente à alfarroba ($p < 0,05$) e a amostra B30 apresenta um valor menor comparativamente à bolota ($p < 0,05$), o que era expectável visto que a B30 sofreu um processo de torra o que fez baixar o conteúdo em água da matriz. Já relativamente às amostras de alfarroba, apenas se notou uma diferença estatisticamente significativa entre a matriz crua e as amostras torradas (A30 e A10), sendo que apesar de ter havido um aumento nos valores obtidos entre as amostras torradas, não se verificou diferenças significativas entre elas.

O teor de cinzas permite também dar uma estimativa aproximada do teor mineral total presente na matriz alimentar, sendo um parâmetro nutricional importante. Neste sentido, em relação aos valores obtidos para o conteúdo em cinzas, a alfarroba apresentou valores um pouco mais altos comparativamente com a bolota ($p < 0,05$), sendo que não se verificou diferenças significativas entre as matrizes cruas e as suas respetivas torradas.

Relativamente ao teor lipídico não há diferenças significativas entre as amostras cruas e as respetivas torradas. Verificou-se que se obteve valores superiores de lípidos para a bolota em relação à alfarroba ($p < 0,05$), constatando-se que a bolota é uma matriz com mais gordura que a alfarroba.

As proteínas são compostos orgânicos de elevada importância nos alimentos, uma vez que desempenham um papel biológico vital, exercendo funções a nível estrutural, enzimático, energético, hormonal e de defesa. O conteúdo em proteínas foi analisado em termos totais e também como proteínas solúveis. Nas duas matrizes em estudo, verifica-se que há diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre as amostras, sendo que a bolota apresenta um teor de proteínas totais superior, mas dentro da mesma ordem de grandeza, ($3,69 \pm 0,01\%$) relativamente à alfarroba ($2,62 \pm 0,01\%$). Entre a bolota e a B30 não se obteve diferenças estatisticamente significativas, o que significa que com o processamento térmico não se perdeu conteúdo proteico, observando-se um comportamento semelhante entre a alfarroba e a A10. Por outro lado, obteve-se um aumento pouco significativo de proteína entre a alfarroba ($2,62 \pm 0,01\%$) e a A10 ($2,68 \pm 0,01\%$) para com a A30 ($3,01 \pm 0,04\%$) ($p < 0,05$). Este ligeiro aumento foi também reportado por Srour et al (2016), que analisou diferentes variedades de alfarroba e constatou que dependia da variedade de alfarroba analisada. No caso deste trabalho a variedade de alfarroba é desconhecida (comercial), e a amostra preparada pode conter uma mistura de diferentes variedades.

Relativamente às proteínas solúveis, a bolota foi a amostra que apresentou valores mais altos e significativamente diferentes em relação às restantes amostras ($p < 0,05$). Pode assim concluir-se que apenas cerca de 2 – 3% das proteínas totais são proteínas solúveis para todas as amostras (bolota, B30, alfarroba, A30 e A10).

Em termos do teor de açúcares totais nas amostras, verificou-se que há diferenças estatisticamente significativas entre todas elas ($p < 0,05$). Analisando os valores obtidos, constata-se que o conteúdo de açúcares na alfarroba ($24,8 \pm 0,5\%$) se destaca de forma considerável em relação aos valores alcançados para a bolota ($5,42 \pm 0,52\%$). Estes valores são expectáveis uma vez que a alfarroba é um fruto caracteristicamente mais doce comparativamente à bolota que apresenta um sabor mais amargo. Consegue-se prever também que o aumento da temperatura durante o processamento das amostras fez com que estas perdessem o teor em açúcar na sua composição, devido à degradação térmica dos mesmos durante a torra.

Por último, foram analisadas as fibras insolúveis que incluem a celulose e a lignina. Através dos valores obtidos, consegue-se aferir que a alfarroba ($31,3 \pm 4,0\%$) contém um maior teor em fibra insolúvel relativamente à bolota ($19,0 \pm 2,5\%$) ($p < 0,05$). A nível estatístico não houve diferenças significativas entre as amostras cruas e as torradas, sendo que o teor de fibras não alterou com o processamento térmico.

Comparando os resultados obtidos com os já reportados por outros autores, verificou-se a nível geral uma concordância de resultados. Silva et al (2016) avaliaram nutricionalmente o pó de duas espécies de bolota, *Q. rotundifolia* e *Q. ilex*, nativas de Montemor-o-Novo em Portugal, e obtiveram respetivamente valores de humidade de 7,45% e 5,4%, cinzas de 2,04% e 1,81 %, lípidos totais 8,44% e 13,41%, proteínas totais 4,55 % e 4,57 % e fibras totais de 17,90% e 10,89%. Todos estes valores encontram-se próximos e dentro da mesma ordem de grandeza que os obtidos para a bolota, exceto o valor de fibras onde os autores obtiveram valores de fibras totais inferiores aos valores obtidos neste estudo para as fibras insolúveis ($19,0 \pm 2,5\%$) No entanto os métodos usados na determinação de fibras foram diferentes (método da digestão com detergente ácida) enquanto Silva et al. efetua a sua determinação com método gravimétrico enzimático, o que pode explicar as diferenças observadas. Em termos de açúcares totais, este têm sido um parâmetro muito pouco investigado para a bolota, mas

Correia et al. (2009) determinaram por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) o conteúdo de açúcar em duas espécies distintas de bolota, *Q. suber* e *Q. rotundifolia*, reportando cerca de 2 – 6,3% e 0,8 – 2,2% de açúcares totais, respetivamente, valores que são bastante próximos do obtido para a bolota neste estudo ($5,42 \pm 0,52$ %).

Relativamente à alfarroba, Avallone et al. (1997) relataram a humidade (6 – 10%), cinzas (1– 6%), lípidos (0,4 – 0,8%) e teor de proteínas (1– 5%) das amostras de polpa de alfarroba provenientes das partes orientais da Sicília (Itália). Os valores obtidos para o presente estudo foram bastante próximos aos valores reportados por Avallone et al. (1997), exceto o conteúdo em lípidos ($1,74 \pm 0,04$ %) que foi ligeiramente superior aos valores publicados por esses autores. Os teores em açúcares e em fibras insolúveis da polpa da alfarroba também foram previamente relatados como 87,5% por Ayaz et al. (2007) e 68,4% por Owen et al. (2003), respetivamente, sendo estes valores superiores aos obtidos neste estudo, $24,8 \pm 0,5$ % para os açúcares e $31,3 \pm 4,0$ % para as fibras insolúveis. Esta diferença pode ser explicada devido aos diferentes tipos de solventes usados na extração destes parâmetros em relação ao que foi realizado neste estudo, uma vez que Ayaz et al. (2007) extraíram os açúcares com etanol à temperatura ambiente e Owen et al. (2003) extraíram as fibras insolúveis com metanol. Em contrapartida, Srouf et al (2016) analisaram o teor de fibra em diferentes variedades de alfarroba através do mesmo método efetuado neste trabalho (com detergente ácido) e reportaram valores bastante aproximados dos obtidos, variando entre 22,4 – 38,7%.

Comparativamente ao perfil nutricional de outros frutos secos bastante consumidos como a castanha europeia (5% proteína; 3% de lípidos; 7,3% fibra; 9,8% açúcares), amêndoa (20% proteína; 48% lípidos; 11,2% fibra; 3,90% açúcares) e avelã (17% proteína; 70% lípidos; 11,2% fibra; 4,3% açúcares), as matrizes analisadas neste trabalho, bolota (3,69% proteína; 4,77% lípidos; 19,0% fibras insolúveis; 5,42% açúcares) e alfarroba (2,62% proteína; 1,74% lípidos; 31,3% fibras insolúveis; 24,8% açúcares), apesar de apresentarem um teor em proteína mais baixo, estima-se que apresentem um teor em fibras totais bastante mais elevado comparativamente a esses frutos (USDA 2002). A alfarroba apresenta valores mais baixos de lípidos do que estes frutos, sendo que a bolota também apresentou valores bastante inferiores comparativamente à amêndoa e à avelã. Por outro lado, a alfarroba obteve um conteúdo em açúcares totais superior relativamente à castanha, à amêndoa e à avelã.

O teor de certos lípidos, como o colesterol LDL e triglicéridos, em excesso no sangue pode representar um importante fator de risco cardiovascular, uma vez que estão associados à aterosclerose que pode dificultar ou impedir a circulação do sangue nos órgãos. Desta forma seria importante conhecer o perfil lipídico das matrizes nomeadamente em relação à sua composição em ácidos gordos polinsaturados, de modo a compreender se traria vantagens ou não para a prevenção de DCV (Bourbon et al., 2016). Noutro sentido, uma ingestão adequada de fibras também possui diversos efeitos protetores para a saúde, pois reduz a pressão arterial, melhora o controlo da glicemia sanguínea em diabéticos, ajuda na perda de peso, melhora o funcionamento intestinal e reduz o colesterol sanguíneo, um fator de risco para a aterosclerose e doença cardíaca (Frij, 2012). Deste modo, o consumo de fibras solúveis parece reduzir a resposta glicémica pós-prandial após refeições ricas em hidratos de carbono, no entanto, diversos estudos revelaram que não é a fibra solúvel a responsável, mas principalmente o consumo de fibra insolúvel de cereais e grãos integrais que está consistentemente associado ao risco reduzido de *diabetes mellitus* tipo II (Bernaud & Rodrigues, 2013).

Conclui-se assim que tanto a bolota como a alfarroba possuem um elevado valor nutricional, destacando-se a sua importância para a diminuição do risco de DCV, tornando estas matrizes

perfeitamente adequadas para o desenvolvimento de novos produtos alimentares funcionais, isentos de glúten, como uma bebida substituta de café, tal como a que foi desenvolvida neste projeto.

Neste contexto, através da análise da Tabela 9, é possível estudar de igual forma a composição química e nutricional das três bebidas funcionais processadas através das matrizes discutidas anteriormente.

Tabela 9. Resultados obtidos para a composição química e nutricional das amostras líquidas.

Parâmetros	Resultados obtidos (% g/100 mL)				
	B1	B2	B3	CF	CEV
Sólidos Totais	3,14 ± 0,01 ^a	2,04 ± 0,02 ^b	4,23 ± 5,29 ^c	1,45 ± 0,01 ^d	5,29 ± 0,04 ^e
Cinzas	0,164 ± 0,002 ^a	0,128 ± 0,005 ^b	0,194 ± 0,008 ^c	0,264 ± 0,002 ^d	0,0959 ± 0,0021 ^e
Lípidos totais	0,0332 ± 0,0028 ^a	0,0684 ± 0,0068 ^{a,c}	0,0668 ± 0,0057 ^{a,c}	0,126 ± 0,022 ^b	0,0886 ± 0,0071 ^{b,c}
Proteínas Solúveis	0,0395 ± 0,0005 ^a	0,0220 ± 0,0012 ^b	0,0448 ± 0,0040 ^a	0,0585 ± 0,0065 ^a	0,0394 ± 0,0066 ^c
Açúcares totais	3,34 ± 0,03 ^a	3,33 ± 0,03 ^a	6,10 ± 0,09 ^b	0,134 ± 0,002 ^c	1,59 ± 0,18 ^d
Fibras insolúveis	0,433 ± 0,094 ^a	0,152 ± 0,039 ^a	0,536 ± 0,255 ^a	0,042 ± 0,018 ^a	0,457 ± 0,026 ^a

Em cada linha, letras diferentes superiores à linha correspondem a diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Em termos de sólidos totais e teor em cinzas, a bebida que obteve valores mais elevados foi a B3, seguida da B1 e B2. Se por um lado estas três bebidas em análise apresentaram maior quantidade de sólidos totais em relação ao CF e menos relativamente à CEV, para o conteúdo em cinzas foi o oposto, onde o CF apresentou um valor mais elevado e a CEV um valor menor comparativamente às bebidas funcionais. As diferenças em ambas as análises foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

O conteúdo em lípidos totais foi semelhante entre as bebidas B1, B2 e B3, não havendo diferenças significativas entre estes valores. Entre as bebidas e o CF houve diferenças significativas, sendo que o CF obteve valores ligeiramente superiores ($p < 0,05$), o que não aconteceu relativamente à CEV, em que não houve diferenças significativas.

Relativamente às proteínas solúveis presentes nas bebidas, na B1 e na B3 não houve diferenças a nível estatístico e apresentam um conteúdo em proteína mais elevado do que a B2 (maioritariamente constituída por bolota, que também tem um mais baixo conteúdo em proteína). Entre o CF e a B1 e B3 também não se encontraram diferenças significativas, sendo que a B2 é a única bebida que apresenta um teor mais baixo comparativamente à CEV.

Os açúcares foram o parâmetro que obteve valores mais altos para as três bebidas, sendo que a B3 apresentou um teor mais alto em açúcares, o que era previsível pois é a bebida mais doce, constituída maioritariamente por alfarroba. Já na B1 e na B2, apesar da segunda conter mais bolota, as diferenças não são estatisticamente significativas. Tanto o CF como a CEV obtiveram valores bastante inferiores aos das bebidas funcionais, o que significa que teoricamente as bebidas B1, B2 e B3 são mais doces. Por último, verificou-se que não há diferenças significativas em todos os valores relativos ao teor de fibras insolúveis obtidos entre as cinco amostras.

Através dos valores obtidos da análise nutricional e comparando com o CF e CEV analisados, consegue-se confirmar que as bebidas funcionais desenvolvidas contêm baixos teores em lípidos, o que poderá ser benéfico em termos cardiovasculares, e níveis de proteína e fibras semelhantes a um café normal. No entanto contêm teores mais altos de açúcar que o CF analisado.

4.1.1. Minerais (Ca, K, Mg e Na)

Os minerais são substâncias inorgânicas, geralmente necessários em pequenas quantidades diárias. Segundo o Decreto de Lei 54/2010, de 28 de maio, pode ser necessário desde menos de 1 mg até 2500 mg por dia, dependendo do mineral. A sua presença é necessária para a manutenção de certos processos físico-químicos essenciais para o funcionamento do organismo e embora não produzam energia, têm papéis importantes a desempenhar em muitas atividades no organismo. Cada forma de matéria viva requer estes elementos inorgânicos ou minerais para os seus processos normais vitais (Aliyu et al, 2015).

Neste capítulo vão ser analisados os macromelementos Ca, K, Mg e Na e os rácios Na/K e Ca/Mg. O cálcio é essencial para a vida humana para a construção e manutenção dos ossos e para auxiliar o sistema nervoso (Frij, 2012). O K e o Na desempenham ambos papéis importantes no controlo da pressão arterial, pois é possível regular a mesma ajustando o conteúdo de Na e K no organismo, ou seja, quem sofre de pressão alta deve diminuir a ingestão de sal, pois é rico em Na, ou aumentar a ingestão de K para a redução da pressão arterial e do risco cardiovascular (Santos et al, 2018). O Mg é um importante cofator encontrado na estrutura de determinadas enzimas atuando em diversas reações metabólicas, necessário também para a atividade hormonal do organismo e para a contração e o relaxamento dos músculos, incluindo o coração. Por outro lado, a ingestão excessiva de alguns minerais pode perturbar o equilíbrio homeostático e causar efeitos colaterais tóxicos. É o caso da ingestão de Na em excesso, que está associado à pressão arterial elevada (Frij, 2012).

Alguns estudos comprovam que uma dieta rica em K, Mg e Ca, presentes em frutas e vegetais, está associada à menor incidência e mortalidade por DCV. O Mg, em especial, tem sido alvo de muitos estudos, havendo uma correlação inversa entre os níveis séricos (quantidade de uma determinada substância no sangue) de Mg e incidência de DCV (Cunha et al, 2011).

Na Tabela 10 encontram-se representados os resultados obtidos para os minerais estudados das amostras sólidas.

Tabela 10. Resultados obtidos para os minerais das amostras sólidas.

Minerais	Resultados obtidos (mg/100 g)				
	Bolota	B30	Alfarroba	A30	A10
Cálcio	28,8 ± 3,5 ^a	24,8 ± 3,0 ^a	239 ± 8 ^b	280 ± 22 ^b	280 ± 25 ^b
Potássio	480 ± 24 ^a	647 ± 30 ^{a,b}	853 ± 149 ^{a,b}	968 ± 31 ^b	870 ± 126 ^b
Magnésio	22,3 ± 3,9 ^a	21,1 ± 0,5 ^a	94,4 ± 10,7 ^b	98,8 ± 2,9 ^b	103 ± 6 ^b
Sódio	33,3 ± 1,0 ^a	32,1 ± 1,1 ^a	120 ± 2 ^b	278 ± 21 ^c	285 ± 34 ^c

Em cada linha, letras diferentes superiores à linha correspondem a diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Para o cálcio obtiveram-se valores mais altos para a alfarroba ($238,6 \pm 8,5$ mg/100 g) e para as suas torras A30 ($280,3 \pm 22,2$ mg/100 g) e A10 ($279,7 \pm 25,2$ mg/100 g) relativamente à bolota ($28,8 \pm 3,5$ mg/100 g) e à B30 ($24,8 \pm 3,0$ mg/100 g) que revelaram valores bastante inferiores. Não se verificaram diferenças significativas entre as matrizes cruas e as suas torras pelo que o teor em cálcio não se alterou após o processamento térmico.

O potássio é o mineral mais abundante em todas as amostras analisadas. Aparentemente a alfarroba (853 ± 149 mg/100 g) apresentou valores superiores aos obtidos para a bolota (480 ± 24 mg/100 g), mas, no entanto, não existem diferenças significativas entre ambas. Por outro lado, pode-se afirmar que a A30 (968 ± 31 mg/100 g) e a A10 (870 ± 126 mg/100 g) apresentaram um maior teor em potássio quando comparadas à bolota crua ($p < 0,05$).

Tal como no cálcio e no potássio, nos resultados obtidos para o magnésio não existe diferenças estatisticamente significativas entre a matriz crua e as respetivas torras. Desta forma, o magnésio é o mineral presente em menor quantidade nas amostras de bolota e de alfarroba, sendo que continua a estar em maior quantidade na alfarroba.

As amostras estudadas também apresentam baixos teores em sódio, essencialmente a bolota ($33,3 \pm 1,0$ mg/100 g) e a B30 ($32,1 \pm 1,1$ mg/100 g). Na alfarroba notou-se um aumento da quantidade de sódio em função da torra, aumentando de 120 ± 2 mg/100 g para 278 ± 21 mg/100 g (A30) e 285 ± 34 mg/100 g (A10), sendo que nestas duas últimas não há diferenças significativas entre elas.

Na totalidade, a alfarroba apresenta um conteúdo em minerais maior comparativamente à bolota, no entanto, ambas apresentam valores mais altos de potássio e mais baixos em magnésio em relação aos outros minerais.

Os resultados obtidos são valores consideráveis e semelhantes quando comparados com outros frutos como por exemplo a castanha que contém teores de Ca = 26,5 – 44,0 mg/100 g, K = 631 – 844,1 mg/100 g, Mg = 47,4 – 75,6 mg/100 g e Na = 24,8 – 30,9 mg/100 g segundo De Vasconcelos et al (2010).

Na literatura também se encontram alguns valores para as matrizes estudadas, sendo que para a farinha de bolota (espécie desconhecida) os autores Szablowska & Tańska (2021) relataram valores de Ca = 164 mg/100 g, K = 379 mg/100 g, Mg = 54,2 mg/100 g, sendo que não foram reportados valores

para o sódio. Os valores de K e Mg enquadram-se dentro da mesma gama de valores obtidos, sendo que o valor de Ca obtido para este trabalho foi inferior ao detetado por Szablowska & Tańska (2021). Para a alfarroba, Loullis & Pinakoulaki (2018) indicaram valores de Ca = 285,4 – 480 mg/100 g, K = 827 – 1010,9 mg/100 g, Mg = 54,0 – 170,0 mg/100 g e Na = 8,5 – 60,8 mg/100 g, sendo que todos são concordantes com os resultados obtidos, exceto o conteúdo em Na que é inferior ao valor neste trabalho.

Os resultados obtidos para os minerais detetados nas bebidas funcionais preparadas e no CF e CEV encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11. Resultados obtidos para os minerais das amostras líquidas.

Minerais	Resultados obtidos (mg / 100 mL)				
	B1	B2	B3	CF	CEV
Cálcio	1,13 ± 0,11 ^a	1,42 ± 0,26 ^a	3,24 ± 0,43 ^b	0,884 ± 0,273 ^a	1,61 ± 0,23 ^a
Potássio	57,1 ± 11,1 ^a	45,5 ± 6,7 ^{a,d}	68,5 ± 3,0 ^{b,c}	86,8 ± 8,2 ^c	29,6 ± 1,4 ^d
Magnésio	1,34 ± 0,11 ^a	1,09 ± 0,21 ^a	5,07 ± 0,43 ^b	5,75 ± 0,33 ^b	0,85 ± 0,04 ^a
Sódio	16,6 ± 2,3 ^a	17,9 ± 2,2 ^a	19,9 ± 1,3 ^a	18,8 ± 0,2 ^a	3,66 ± 0,95 ^b

Em cada linha, letras diferentes superiores à linha correspondem a diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Através da análise destes dados é possível verificar que as bebidas não contêm grandes quantidades de minerais na sua composição, sendo que possivelmente grande parte dos minerais presentes nas matrizes não foram dissolvidos pela água durante a extração realizada, uma vez que muitos minerais por estarem ligados a moléculas orgânicas não são solúveis na fase líquida (Miller, 2017). No entanto, as bebidas em geral apresentam maiores quantidades de potássio e sódio e quantidades muito baixas de cálcio e magnésio.

Comparativamente ao CF e à CEV, as bebidas B1, B2 e B3 apresentaram valores de minerais semelhantes, o que pode mostrar o seu potencial como substituto de café.

Nas Tabelas 12 e 13 encontram-se os valores obtidos para o teor de sal presente nas amostras sólidas e bebidas, respetivamente, assim como o rácio sódio/potássio e cálcio/magnésio. Os quocientes Na/K e Ca/Mg demasiado altos estão associados a um maior risco de desenvolver subsequentemente DCV. A OMS propõe como valor alvo para o quociente Na/K um valor inferior a 1, sendo considerados como razoáveis valores entre 1,0 e 1,2 (Santos et al, 2018) e de acordo com a World Health Organization (2012) o valor máximo que se deve consumir de sal é de 5 g por dia. Para o quociente Ca/Mg o valor ideal é cerca de 2,13.

Tabela 12. Teor de sal, rácio Na/K e Ca/Mg das amostras sólidas em análise.

Amostras	Teor de Sal (g/100 g)	Rácio Sódio/Potássio	Rácio Cálcio/Magnésio
Bolota	0,0832 ± 0,0026 ^a	0,0696 ± 0,0054 ^a	1,30 ± 0,33 ^a
B30	0,0801 ± 0,0028 ^a	0,0497 ± 0,0039 ^a	1,17 ± 0,12 ^a
Alfarroba	0,300 ± 0,006 ^{a,b}	0,187 ± 0,081 ^a	2,53 ± 0,22 ^b
A30	0,500 ± 0,343 ^{a,b}	0,207 ± 0,141 ^b	2,84 ± 0,24 ^b
A10	0,712 ± 0,084 ^b	0,336 ± 0,093 ^b	2,72 ± 0,28 ^b

Em cada coluna, letras diferentes superiores à linha entre amostras sólidas correspondem a diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela 13. Teor de sal, rácio Na/K e Ca/Mg das bebidas em análise.

Amostras	Teor de Sal (g/100 g)	Rácio Sódio/Potássio	Rácio Cálcio/Magnésio
B1	0,0415 ± 0,0057 ^a	0,293 ± 0,028 ^a	0,843 ± 0,016 ^a
B2	0,0447 ± 0,0055 ^a	0,397 ± 0,065 ^b	1,30 ± 0,02 ^b
B3	0,0497 ± 0,0032 ^a	0,291 ± 0,021 ^a	0,639 ± 0,106 ^a
CF	0,0470 ± 0,0006 ^a	0,218 ± 0,018 ^{a,c}	0,154 ± 0,050 ^c
CEV	0,00916 ± 0,00238 ^b	0,125 ± 0,038 ^c	1,90 ± 0,20 ^d

Em cada coluna, letras diferentes superiores à linha entre bebidas correspondem a diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Verifica-se que os teores de sal presentes em todas as amostras são muito baixos e muito inferiores à dose máxima recomendada (5 g/ dia). Em relação ao rácio Na/K todas as amostras apresentam valores inferiores a 1. O mesmo se verificou para o rácio Ca/Mg com valores aproximados de 2, exceto para a B1, B3 e para o CF em que os valores foram mais baixos que o ideal.

Segundo o Decreto de Lei 54/2010, de 28 de maio, a quantidade a tomar em consideração para decidir o que constitui uma quantidade significativa para a ingestão diária de um nutriente, corresponde a 15% da dose diária recomendada (DDR). De acordo com o regulamento (EU) n.º 1169/2011 de 25 de outubro de 2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, a DDR para o Ca, K e Mg são respetivamente 800 mg/100 mL, 2000 mg/100 mL, 375 mg/100 mL e segundo a World Health Organization (2012) a DDR para o Na é de 2000 mg/100 mL.

Nas Tabelas 14, 15, 16 e 17 estão representados a dose de cada mineral estudado em 35 mL de bebida (dosagem média de um café), assim como a contribuição dessa dose para a DDR.

Tabela 14. Dose de cálcio numa bebida de 35mL e a sua contribuição para a DDR.

Amostras	Cálcio	
	Dose em 35 mL (mg)	Contribuição para a DDR (%)
B1	0,396	0,0494
B2	0,497	0,0621
B3	1,13	0,142
CF	0,309	0,0387
CEV	0,564	0,0704

Tabela 15. Dose de potássio numa bebida de 35mL e a sua contribuição para a DDR.

Amostras	Potássio	
	Dose em 35 mL (mg)	Contribuição para a DDR (%)
B1	20,0	2,50
B2	15,9	1,99
B3	24,0	3,00
CF	30,4	3,80
CEV	10,4	1,30

Tabela 16. Dose de magnésio numa bebida de 35mL e a sua contribuição para a DDR.

Amostras	Magnésio	
	Dose em 35 mL (mg)	Contribuição para a DDR (%)
B1	0,469	0,0586
B2	0,382	0,0477
B3	1,78	0,222
CF	2,01	0,252
CEV	0,298	0,0372

Tabela 17. Dose de sódio numa bebida de 35mL e a sua contribuição para a DDR.

Amostras	Sódio	
	Dose em 35 mL (mg)	Contribuição para a DDR (%)
B1	5,81	0,726
B2	6,27	0,783
B3	6,97	0,871
CF	6,58	0,823
CEV	1,28	0,160

Com estes resultados, pode verificar-se que as bebidas não contribuem significativamente para a ingestão diária dos minerais analisados, mas poderão ser incluídos numa alimentação diversificada.

4.1.2. Valor energético das bebidas funcionais

De acordo com o regulamento (EU) n.º 1169/2011 de 25 de outubro de 2011, a nível calórico, a dose de referência (DR) de ingestão de calorias para um adulto médio (cerca de 70 kg) é de 2000 Kcal. Analisando o valor energético representado na Tabela 18, comprova-se que as bebidas desenvolvidas são muito pouco calóricas, o que ajuda a reduzir o risco de DCV quando consumidas.

Tabela 18. Valores de energia das bebidas preparadas.

Amostras	Valor energético (kcal/100 mL)
B1	22,6
B2	22,5
B3	33,6
CF	15,6
CEV	9,89

Verifica-se que a B3, é a bebida que apresenta maior valor calórico provavelmente relacionado com o alto teor de açúcares que apresenta na sua constituição.

4.2. Análise da atividade antioxidante

Nas DCV, assim como noutros tipos de doenças, ocorrem alterações oxidativas que podem ser provocadas por radicais livres, resultantes do *stress* oxidativo a nível celular. Este é causado devido a um desequilíbrio que ocorre entre a produção de compostos oxidativos (como radicais livres), que são prejudiciais quando presentes em excesso, e a defesa antioxidante do organismo. Em organismos aeróbios, os radicais livres são constantemente produzidos durante o funcionamento normal da célula, na maior parte sob a forma de espécies reativas de oxigénio (ROS) e de nitrogénio (RNS) (Alves, 2019).

Os antioxidantes são assim moléculas capazes de se ligar aos radicais livres, ou seja, impedir que estes elementos ataquem as células, de forma a estabelecer um equilíbrio com os efeitos que advêm das espécies oxidantes, a fim de evitar o *stress* oxidativo. Estes podem ser de origem natural ou sintética, podendo provir do metabolismo ou da dieta, respetivamente, e são classificados em duas categorias principais: os antioxidantes enzimáticos e os não enzimáticos. Os antioxidantes não enzimáticos podem por sua vez ser agrupados em compostos endógenos e exógenos, sendo que os compostos fenólicos como os flavonoides (flavonóis, isoflavonas, flavan-3-ols) e os taninos, são exemplos dos principais antioxidantes exógenos (Valente, 2014; Alves, 2019).

A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é assim uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo, sendo cada vez mais importante o consumo de antioxidantes presentes em alimentos (Alves, 2019). Nesse sentido, foi essencial para este trabalho avaliar a capacidade antioxidante das matrizes usadas (bolota e alfarroba) e das bebidas funcionais desenvolvidas, de forma a confirmar o seu potencial na prevenção de DCV.

4.2.1. Quantificação dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são os antioxidantes mais abundantes na dieta humana e podem ser divididos em várias classes, destacando-se os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos (hidrolisados ou condensados), como sendo os antioxidantes fenólicos mais disseminados na natureza, que apresentam alta atividade biológica (Ferreira, 2015). Neste trabalho, além do teor de compostos fenólicos totais (TPC), foi também estudado o teor de flavonoides totais (TFC) e taninos condensados presentes nas amostras em estudo.

Nas Tabelas 19 e 20 estão representados os valores obtidos para o TPC, TFC e taninos condensados presentes nos extratos analisados das amostras sólidas (bolota e alfarroba) e das bebidas, respetivamente.

Tabela 19. Valores obtidos para o conteúdo em fenólicos totais (TPC), flavonoides totais (TFC) e taninos condensados presentes nas amostras sólidas.

Amostras	TPC (mg EAG/100 g)	TFC (mg EEC/100 g)	Taninos condensados (mg EC/100 g)
Bolota	1551 ± 6 ^a	689 ± 282 ^a	45,7 ± 0,2 ^a
B30	2729 ± 22 ^b	918 ± 254 ^a	194 ± 2 ^b
Alfarroba	859 ± 19 ^c	634 ± 24 ^a	173 ± 1 ^c
A30	1808 ± 6 ^d	990 ± 44 ^a	330 ± 2 ^d
A10	1329 ± 6 ^e	896 ± 127 ^a	267 ± 2 ^e

Nota: Os valores de TPC estão expressos em EAG (equivalentes de ácido gálglico, mg/100 g amostra seca), TFC em EEC (equivalentes de epicatequina, mg/100 g amostra seca) e dos taninos condensados em EC (equivalentes em catequina, mg/100 g amostra seca). Para cada coluna, letras diferentes superiores à linha correspondem a diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Segundo os valores obtidos na Tabela 18, pode-se observar que todos os valores que dizem respeito ao TPC apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) e com isso é possível afirmar que a B30 é a amostra que apresenta um maior conteúdo em compostos fenólicos, seguido da A30, bolota, A10 e por fim a alfarroba. Pode verificar-se que, com a torra da bolota (B30) e com o aumento das torras efetuadas à alfarroba (A30 e A10), o teor destes compostos aumentou relativamente às respetivas matrizes cruas. Segundo Şahin et al. (2009), tal aumento pode dever-se ao facto de que o reagente Folin-Ciocalteu deteta todos os grupos fenólicos presentes nas amostras, não só os fenólicos naturais, mas também os compostos recém-formados durante a torra, como alguns dos produtos de reação de *Maillard*, como as melanoidinas, que também são compostos antioxidantes.

Em relação ao TFC, todas os valores obtidos mostraram não ter diferenças estatisticamente significativas, o que significa que não há formação de novos compostos flavonoides com a torra das matrizes. No entanto, todos os resultados apresentados para os taninos condensados mostraram ter diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Tal como aconteceu para o TPC nota-se um aumento do teor de taninos nas amostras torradas, devido presumivelmente à formação de compostos antioxidantes da reação de *Maillard*, como já explicado anteriormente. É de notar também que a alfarroba apresenta maior quantidade de taninos condensados quando comparada à bolota.

Os taninos causam o sabor amargo e adstringente dos alimentos e podem apresentar propriedades anti-nutricionais em concentrações mais elevadas, sendo que a ingestão excessiva destes compostos pode provocar danos no epitélio intestinal, fígado, e tecidos renais. Por outro lado, os compostos fenólicos, presentes nas matrizes em quantidades significativas, juntamente com os taninos, são derivados do ácido gálglico, incluindo o galhato de metilo, sendo que estes compostos podem desempenhar um papel importante na prevenção de doenças e apresentar efeitos anti-inflamatórios, anticarcinogénicos e antimutagénicos além de propriedades antioxidantes (Szabłowska & Tańska, 2021).

Na bolota o teor de flavonoides e de taninos correspondem a cerca de 44% e 3%, respetivamente, do conteúdo total de compostos fenólicos analisados e na alfarroba estes valores correspondem a cerca de 74% e 20%. No que concerne às amostras torradas, a diferença de valores apresenta a mesma

tendência, sendo que os compostos fenólicos totais são constituídos por cerca de 34% e 7% para a B30, 55% e 18% para a A30 e 67% e 20% para a A10, de flavonoides e taninos condensados, respetivamente.

O elevado teor de compostos fenólicos na bolota tem sido confirmado por alguns investigadores. Vinha et al (2016c) reportaram valores de TPC = 1800 mg EAG/100 g para a espécie *Q. ilex*, TPC = 3100 mg EAG/100 g para a espécie *Q. faginea* e TPC = 2800 mg EAG/100 g para a espécie *Q. suber*. Estes valores não são muito diferentes dos obtidos neste trabalho, contudo o facto de que no pré-tratamento das bolotas se ter efetuado uma lavagem com vinagre para eliminar possíveis fungos presentes, pode ter feito com que muitos compostos solúveis tivessem sido lixiviados e ser essa a razão dos valores mais baixos obtidos.

Em relação à alfarroba, os valores encontrados na literatura são semelhantes aos obtidos neste trabalho. Benchikh & Louailèche (2014) analisaram um extrato da polpa da alfarroba da espécie *Ceratonia siliqua* L. obtido com acetona, através do ensaio colorimétrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Neste estudo e comparativamente aos resultados obtidos neste trabalho, a alfarroba apresentou valores maiores de conteúdo fenólico (TPC = 1625 mg EAG/100 g) e valores mais baixos de flavonoides (TFC = 292 mg EQ/100 g, com EQ – quercetina). Por outro lado, Avallone et al (1997) obtiveram resultados ligeiramente mais baixos, mas dentro da mesma gama de valores para os taninos condensados (275 mg EC/100 g) através de um ensaio com vanilina e uma extração com acetona.

Além da comparação com valores de literatura, é importante comparar também com frutos já bem conhecidos pelo seu poder antioxidante como é o exemplo dos mirtilos e das amoras. Neste sentido, Li et al. (2013) reportaram valores de TPC = 2600 mg EAG/ 100 g de extratos etanólicos de mirtilos e Cosmulescu et al. (2017) encontraram valores de TPC = 412,38 mg EAG/100 g de amoras silvestres europeias. Deste modo, estes valores provam que tanto a bolota como a alfarroba são matrizes com alto poder antioxidante, obtendo valores semelhantes ou até maiores de compostos fenólicos comparativamente a estes frutos.

No que diz respeito às bebidas desenvolvidas (Tabela 20), verifica-se que igualmente ao que aconteceu nas amostras sólidas, os compostos fenólicos analisados nas bebidas são maioritariamente constituídos por flavonoides e apresentam menor quantidade de taninos condensados.

Tabela 20. Valores obtidos para o conteúdo em fenólicos totais (TPC), flavonoides totais (TFC) e taninos condensados presentes nas bebidas funcionais desenvolvidas.

Amostras	TPC (mg EAG/100 mL)	TFC (mg EEC/100 mL)	Taninos condensados (mg EC/100 mL)
B1	236 ± 1,1 ^a	36,6 ± 0,5 ^a	23,0 ± 0,2 ^a
B2	275 ± 1,1 ^b	39,6 ± 1,0 ^a	15,8 ± 0,2 ^b
B3	212 ± 1,6 ^c	34,2 ± 0,5 ^a	25,3 ± 0,4 ^c
CF	397 ± 2,1 ^d	345 ± 4,1 ^b	8,70 ± 0,40 ^d
CEV	127 ± 0,4 ^e	82,7 ± 0,3 ^c	11,7 ± 0,2 ^e

Para cada coluna, letras diferentes superiores à linha correspondem a diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Nos resultados obtidos para o TPC e para os taninos condensados verificou-se diferenças estatisticamente significativas entre todas as amostras ($p < 0,05$), sendo possível afirmar que nas bebidas B1, B2 e B3, apesar dos valores serem relativamente próximos, a B2 é a bebida funcional com maior teor em compostos fenólicos, seguido da B1 e por último a B3, tendo todas valores superiores aos obtidos para a CEV. No entanto, apresentam uma menor quantidade comparando com o CF. Relativamente aos taninos condensados a B3 e a B1 obtiveram teores bastante próximos, sendo que a B2 apresentou valores inferiores a estas. Por sua vez, comparando com o CF e a CEV as bebidas preparadas mostraram ter mais conteúdo em taninos condensados, o que se reflete num sabor mais adstringente como confirmado anteriormente na análise sensorial preliminar.

O teor em TFC foi estatisticamente semelhante entre as três bebidas funcionais, mostrando não haver diferenças nos seus conteúdos em flavonoides, porém, o CF obteve valores bastante superiores comparativamente a estas.

4.2.2. pH e Produtos da reação de *Maillard*

A reação de *Maillard* é uma reação química de escurecimento não enzimático que ocorre entre os grupos amina das proteínas e os açúcares redutores. Ela induz o escurecimento dos alimentos através de processamentos térmicos (sem água), o que garante a segurança microbiológica, a inativação de algumas enzimas, a degradação de substâncias tóxicas e, ainda, o desenvolvimento de substâncias (produtos da reação) responsáveis pelo aroma, cor e sabor, melhorando a sua palatabilidade (Van Boekel, 2016). Estes compostos denominados por produtos da reação de *Maillard* são biologicamente ativos e podem ser benéficos para a saúde, por apresentarem atividade antioxidante e anti-mutagénica. Por outro lado, podem ter um efeito sobre o valor nutritivo, uma vez que podem levar à perda de nutrientes e ter implicações toxicológicas (como a formação de acrilamida) (Shibao & Bastos, 2011).

Desta forma, os produtos da reação de *Maillard* encontrados em alimentos permitem avaliar a intensidade do processamento térmico aplicado, bem como as prováveis alterações nutricionais relacionadas a ele. Entre estes compostos está o hidroximetilfurfural (HMF), um marcador da fase intermediária da reação de *Maillard* que se pode polimerizar com grupos amino, originando as melanoidinas, polímeros azotados de cor castanha que apresentam efeitos biológicos positivos devido à sua atividade antioxidante (Francisquini et al, 2017). Contudo, a produção de HMF em concentrações muito elevadas pode ser tóxico para a saúde humana, sendo que os níveis seguros de consumo deste composto ainda não são bem esclarecidos (Morales, 2008).

A reação de *Maillard*, assim como as atividades antioxidantes dos seus produtos, podem afetar mais o pH dos sistemas do que a degradação térmica. Neste sentido, já foi comprovado por diversos estudos que a reação de *Maillard* tem tendência a diminuir o pH das soluções em análise devido ao consumo de grupos de aminoácidos e à produção de ácidos orgânicos que acontece durante a reação (Soares et al, 2021).

Na Figura 31, encontram-se os espectros obtidos de todos os compostos que foram detetados por absorvância UV-Vis a vários comprimentos de onda, incluindo os produtos formados pela reação de *Maillard* presentes nas amostras analisadas. Estes espetros mostram essencialmente as alterações antes e após a torra de forma a verificar as mudanças que aconteceram com o processamento térmico. As amostras estão divididas em três espectros (A – Bolota e B30; B – Alfarroba, A30 e A10; C – B1, B2, B3, CF e CEV), todos com uma imagem com amplificação detalhada das regiões onde se consegue ver os picos máximos de absorvância a certos comprimentos de onda de cada uma.

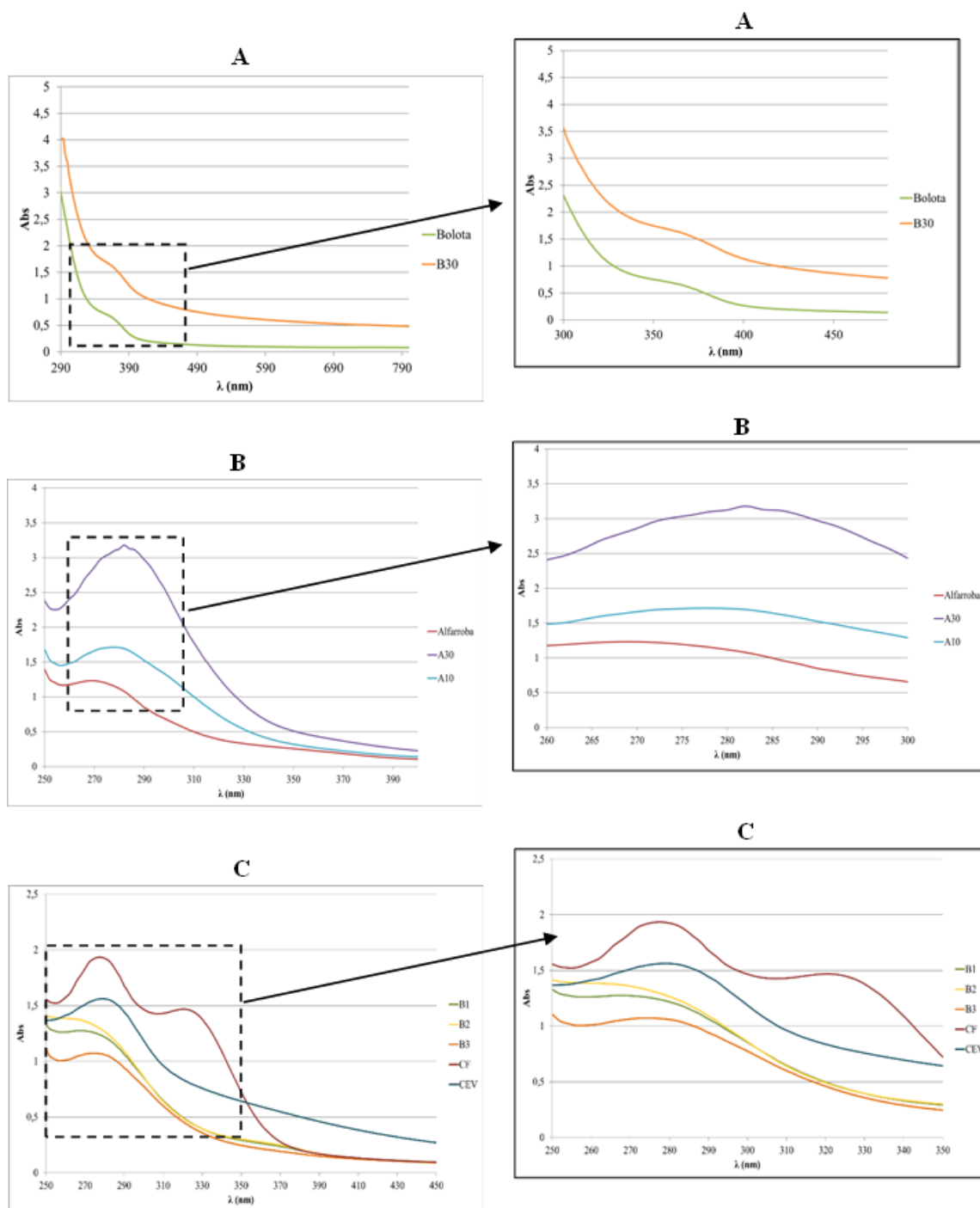


Figura 31. Espectros obtidos dos produtos da reação de Maillard presentes nas amostras: A1/A2 – Bolota e B30; B1/B2 – Alfarooba, A30 e A10; e C1/C2 – bebidas: B1, B2, B3, CF e CEV.

Além das alterações de intensidade que se observam em todos os espectros, no espectro A1 é possível verificar que existe uma alteração no perfil da B30 em relação à bolota, observando-se apenas que na amostra B30 há uma maior quantidade de compostos corados que se formaram durante o processo de torra da matriz. No espectro A2 observa-se um aumento de absorvância em ambas as amostras no comprimento de onda por volta de 360 nm, que é a região dos produtos acastanhados. Em relação ao espectro B1, também se observa um deslocamento do comprimento de onda do máximo de absorção entre a alfarroba ($\lambda_{\max} = 272 \text{ nm}$) e as torradas (A30, $\lambda_{\max} = 282 \text{ nm}$; A10, $\lambda_{\max} = 280 \text{ nm}$), sendo

que se nota uma maior alteração na amostra A30 que foi processada a temperaturas mais elevadas. Pode concluir-se que a temperatura favoreceu a formação de produtos da reação de *Maillard* e aumentou a intensidade da cor. Já no espectro B2 consegue-se ver de forma mais clara que houve uma deslocação do pico máximo da matriz crua ($\lambda_{\max} = 275\text{-}285$ nm) para as amostras A10 ($\lambda_{\max} = 270\text{-}280$ nm) e A30 ($\lambda_{\max} = 280\text{-}290$ nm), comprovando que houve a formação de compostos durante a torra da alfarroba.

No espectro C1 verifica-se que houve uma alteração de perfil entre as três bebidas desenvolvidas, sendo que a bebida que contém mais teor de bolota (B2) foi a que apresentou um limite máximo de absorção maior comparativamente às restantes, seguindo-se a B1 e a B3, esta última constituída maioritariamente por alfarroba. Todas apresentaram picos máximos de absorvância no comprimento de onda entre $\lambda_{\max} = 270\text{-}280$ nm. Comparativamente ao CF e à CEV, verifica-se que estes têm perfil de cor mais acentuados por volta da mesma região, sendo que o CF demonstrou ter dois picos, sendo um deles devido possivelmente à absorção da cafeína ($\lambda_{\max} = 273$ nm) (Teixeira, 2011).

Neste sentido, através da análise destes espectros pode-se concluir que após a torra, há sempre uma alteração do perfil devido à formação ou destruição de compostos, o que se reflete posteriormente no perfil dos espectros das bebidas desenvolvidas.

Estes resultados estão em concordância com o índice de acastanhamento obtido representado nos dois gráficos da Figura 32 (linha azul). Neste contexto, analisando o gráfico A, verifica-se que o índice de acastanhamento foi maior na B30 comparativamente à A30 e A10, com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), verificando-se uma subida deste parâmetro conforme o aumento do grau de torra para a alfarroba. Nas bebidas B1, B2 e B3 os resultados também foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), observando-se níveis de acastanhamento não muito distintos entre si. Por outro lado, o CF e essencialmente a CEV apresentaram índices de acastanhamento superiores comparativamente às bebidas funcionais, o que já era esperado visto que são bebidas visualmente mais escuras preparadas com outras condições de torra.

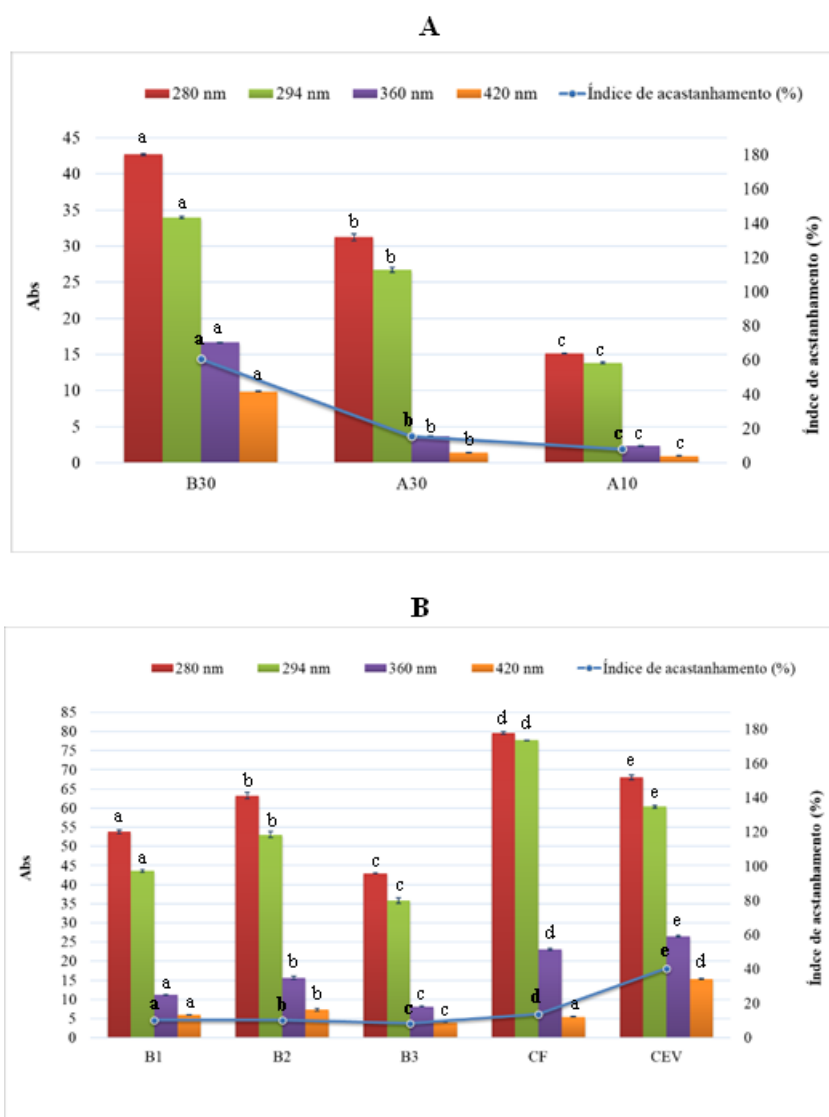


Figura 32. Produtos da reação de Maillard e índice de acastanhamento para as amostras em estudo: A) Bolota e B30; B) Alfarroba, A10 e A30; C) Bebidas – B1, B2, B3, CF e CEV. Os resultados estão expressos como média \pm DP de duas experiências. Para cada comprimento de onda e entre índices de acastanhamento, letras diferentes correspondem a diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Os produtos intermediários (sem cor) da reação de *Maillard* são geralmente detetados por absorvância a 294 nm, enquanto os compostos da fase final da reação (produtos acastanhados) são detetados a 360 e 420 nm. Os compostos intermédios são considerados precursores dos produtos de escurecimento na reação de *Maillard* ou caramelização, e na fase final, as melanoidinas ($\lambda = 420$ nm), são produzidas a partir de produtos intermédios ativos como o HMF ($\lambda = 280$ nm) (Gomes et al, 2022).

A nível geral, comparando as torradas, a B30 foi a que mostrou uma maior quantidade de compostos de cor (acastanhamento), e também de outros produtos formados pela reação, como os produtos intermediários e os produtos finais como as melanoidinas. Quanto ao produto HMF (colunas a vermelho), verificou-se que aparentemente este é o composto maioritário presente nas amostras, sendo que se observa um acréscimo do mesmo nas amostras torradas.

Os produtos intermediários (colunas a verde), os produtos acastanhados (colunas a roxo) e as melanoidinas (colunas a laranja) também foram detetados em maiores quantidades nas amostras B30,

A30 e A10 em relação às matrizes, sendo que as melanoidinas são o produto presente em menor quantidade nas amostras. Analisando todos estes parâmetros, comprova-se que com o aumento do processo de torra das amostras aumentou a formação de todos os produtos de *Maillard*, o que era expectável uma vez que esta reação aumenta conforme o aumento da temperatura durante processamentos térmicos, dando origem a produtos cada vez mais escuros.

No que diz respeito às bebidas funcionais desenvolvidas, os resultados mostraram que a nível global estas apresentam menos produtos formados pela reação de *Maillard* em comparação com o CF e a CEV. No entanto, é possível observar que o teor em melanoidinas entre as três bebidas e o CF foi muito semelhante, sendo o valor obtido para a B2 superior ao do CF, devido provavelmente ao maior conteúdo em bolota dessa mesma bebida.

Foram também analisados os produtos finais de glicação avançada (AGEs), compostos formados na fase final da reação de *Maillard*, que estão associados a efeitos negativos na saúde, quando em níveis elevados, como em condições de hiperglicemia ou *stress* oxidativo, podendo alcançar os tecidos e a circulação tornando-se patogénicos (Francisquini et al, 2017).

Os AGEs, são outros produtos da reação de *Maillard* que têm uma forte emissão de luz entre 400 e 500 nm, após excitação a 360 ou 370 nm. Em geral, como demonstrado na Tabela 21, o conteúdo de AGEs fluorescentes nas matrizes foi bastante inferior às amostras torradas ($p < 0,05$), o que significa que aumenta o risco na saúde com o aumento da temperatura a que a amostra está sujeita.

Desta forma, estes produtos formam-se durante a torra e são extraídos para as bebidas aquando do preparo das mesmas. As bebidas B1 e B2 não apresentam diferenças estaticamente significativas, sendo que a B3 obteve um valor ligeiramente maior (2233 ± 7) que as restantes ($p < 0,05$). No entanto, o CF e a CEV apresentaram um maior teor em AGEs, o que significa que as bebidas funcionais desenvolvidas apresentam menor risco para a saúde humana quando consumidas, em comparação com um café ou uma cevada.

Tabela 21. Produtos finais de glicação avançada (AGEs) formados durante a reação de *Maillard* das amostras.

AGEs ($\lambda_{exc} = 360/40$; $\lambda_{em} = 460/40$)	
Bolota	$40,8 \pm 1,4^a$
B30	459 ± 10^b
Alfarroba	130 ± 1^c
A30	761 ± 13^d
A10	559 ± 18^e
B1	2043 ± 7^a
B2	2033 ± 7^a
B3	2233 ± 7^b
CF	3578 ± 14^c
CEV	4972 ± 64^d

Em cada coluna, letras diferentes superiores à linha entre amostras sólidas ou entre bebidas correspondem a diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Outro parâmetro a analisar neste capítulo é o pH, pois além da influência que a reação de *Maillard* exerce sobre o pH, como já explicado anteriormente, a sua medição na produção de bebidas é um indicador essencial da sua qualidade, segurança microbiológica e conservação dos alimentos (Andrés-Bello et al, 2013).

Na Tabela 22, encontram-se os valores obtidos de pH medidos nas soluções aquosas preparadas das amostras sólidas e das bebidas em análise. Nas matrizes, foi observada uma diminuição do pH com o aumento da torra para as amostras de alfarroba, tendo em conta que as diferenças são significativas ($p < 0,05$). Entre a bolota e a B30 também baixou o valor de pH com a torra ($p < 0,05$) sendo que a solução de bolota apresentou valores mais baixos comparativamente às restantes, traduzindo-se numa solução mais ácida.

Tabela 22. Valores de pH obtidos de todas as amostras em análise.

pH	
Bolota	$4,87 \pm 0,01^a$
B30	$4,71 \pm 0,01^b$
Alfarroba	$5,24 \pm 0,01^c$
A30	$4,72 \pm 0,01^b$
A10	$5,04 \pm 0,01^d$
B1	$4,83 \pm 0,01^a$
B2	$4,71 \pm 0,01^b$
B3	$4,93 \pm 0,01^c$
CF	$5,30 \pm 0,01^d$
CEV	$4,63 \pm 0,01^e$

Em cada coluna, letras diferentes superiores à linha entre amostras sólidas ou entre bebidas correspondem a diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

A maioria das variedades de café são ácidas, com um valor médio de pH de 4,85 a 5,10 (Rao & Fuller, 2018). As bebidas funcionais desenvolvidas neste trabalho enquadram-se dentro dessa gama de pH, e obtiveram valores parecidos aos do CF e da CEV, embora com diferenças significativas entre eles.

4.2.3. Atividade de sequestro do radical DPPH[•] e ABTS^{•+}

O potencial antioxidante das amostras também foi analisado pela capacidade de sequestro dos radicais livres DPPH[•] e ABTS^{•+}. Nas Tabelas 23 e 24 estão representados os valores obtidos para as concentrações das amostras sólidas e das bebidas, respetivamente, em equivalentes de trolox que

inibem na totalidade os radicais, tendo em conta que o trolox é um controlo positivo com bastante atividade antioxidante.

Tabela 23. Valores obtidos para o sequestro do DPPH[•] e do ABTS^{•+} das amostras sólidas.

Amostras	DPPH [•] (mg ET/100 g)	ABTS ^{•+} (mg ET/100 g)
Bolota	2,86 ± 0,11 ^a	5,46 ± 0,41 ^a
B30	4,20 ± 0,35 ^b	8,84 ± 0,04 ^b
Alfarroba	0,750 ± 0,100 ^c	1,71 ± 0,21 ^c
A30	1,74 ± 0,06 ^d	8,48 ± 0,09 ^b
A10	1,08 ± 0,23 ^{c,d}	3,03 ± 0,06 ^d

Em cada coluna, letras diferentes superiores à linha correspondem a diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Analisando as concentrações obtidas para os dois métodos estudados para as amostras sólidas, os resultados demonstram que os extratos analisados têm maior capacidade de sequestro do radical ABTS^{•+} comparativamente ao radical DPPH[•], e que a bolota tem um maior poder antioxidante que a alfarroba, uma vez que as concentrações em trolox foram superiores ($p < 0,05$). A única exceção é a amostra A30 que apresentou um valor de sequestro de ABTS^{•+} semelhante à B30.

Nos dois métodos, a Bolota e a B30 apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), pelo que se pode concluir que a torra na bolota aumentou a capacidade antioxidante em ambos os casos. O mesmo se verificou entre a alfarroba e a A30 para os valores de DPPH e entre a alfarroba e a A30 e A10 para os valores obtidos no método ABTS. Entretanto no método de sequestro de DPPH[•] não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre a amostra A10 e a alfarroba e A30.

Através da Tabela 24, pode-se verificar que tal como para as amostras sólidas, os resultados mostram que as bebidas analisadas têm maior capacidade de sequestro do radical ABTS^{•+} comparativamente ao radical DPPH[•].

Tabela 24. Valores obtidos para o sequestro do DPPH[•] e do ABTS^{•+} das bebidas.

Amostras	DPPH [•] (mg ET/100 mL)	ABTS ^{•+} (mg ET/100 mL)
B1	286 ± 11 ^a	494 ± 8 ^a
B2	405 ± 1 ^b	509 ± 12 ^a
B3	296 ± 17 ^a	433 ± 1 ^b
CF	265 ± 19 ^a	596 ± 7 ^d
CEV	<LOD ^c	109 ± 21 ^c

Nota: O valor do LOD é igual a 0,000200 mg ET/100 mL; Em cada coluna, letras diferentes superiores à linha correspondem a diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

No método de sequestro de DPPH[•], não há diferenças significativas entre a amostra B1, B3 e a CEV, sendo que a B2 foi a que obteve uma maior concentração em equivalentes de trolox. Já no método de sequestro do ABTS^{•+} as bebidas B1 e B2 (sem diferenças estatisticamente significativas) foram as que obtiveram valores mais altos quando comparado com a B3.

Comparando os valores obtidos das bebidas funcionais com o CF e a CEV, verifica-se que a nível geral, se alcançou valores mais altos nas bebidas funcionais no método DPPH, exceto entre a B1 e a CEV, que não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Para o método ABTS as bebidas apresentaram concentrações mais altas relativamente ao CF ($p < 0,05$), e a CEV foi a amostra que exibiu uma maior concentração em equivalentes de trolox para este método.

Outra forma de avaliar a atividade antioxidante através do sequestro destes radicais, é analisar a concentração das amostras que equivalem ao IC₅₀, ou seja, a concentração que é necessária dos extratos das amostras (antioxidantes) para reduzir em 50% os radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, sendo que quanto menor o valor IC₅₀, maior a atividade antioxidante presente nas amostras em estudo.

Em relação ao radical DPPH[•] não foi possível chegar a valores de IC₅₀ para as concentrações testadas, sendo importante como trabalho futuro testar concentrações mais altas às estudadas. Contudo, para as amostras sólidas obtiveram-se as seguintes percentagens de inibição para diferentes concentrações máximas testadas no poço: Bolota – $34,0 \pm 2,1\%$ para uma concentração de $7,5 \mu\text{g/mL}$; B30 – $41,2 \pm 4,7\%$ para $8,8 \mu\text{g/mL}$; Alfarrofa – $31,8 \pm 2,6\%$ para $368 \mu\text{g/mL}$; A30 – $27,3 \pm 1,9\%$ para $61,4 \mu\text{g/mL}$; e A10 – $43,4 \pm 4,2\%$ para $330 \mu\text{g/mL}$. Para as bebidas funcionais obteve-se para uma concentração máxima de $222 \mu\text{g/mL}$ para: B1 – $39,4 \pm 0,8\%$; B2 – $42,1 \pm 0,6\%$; e B3 – $40,2 \pm 1,3\%$. E para o CF obteve-se cerca de $42,5 \pm 1,2\%$ para uma concentração de $148 \mu\text{g/mL}$ e para a CEV $17,2 \pm 1,0\%$ para uma concentração de $178 \mu\text{g/mL}$.

Por outro lado, obtiveram-se valores de IC₅₀ para a atividade de sequestro do ABTS^{•+} nas concentrações testadas, representados na Tabela 25.

Tabela 25. Valores obtidos para a atividade de sequestro do ABTS.

IC₅₀ (µg/mL)	
Trolox	4,79 ± 0,24 ^a
Bolota	6,04 ± 0,15 ^a
B30	3,08 ± 0,16 ^a
Alfarroba	203 ± 5 ^b
A30	38,0 ± 1,5 ^c
A10	103 ± 11 ^d
B1	65,3 ± 0,3 ^{e,g}
B2	65,7 ± 2,7 ^e
B3	83,0 ± 2,1 ^f
CF	53,4 ± 0,4 ^g
CEV	281 ± 5 ^h

Letras superiores à linha diferentes correspondem a diferenças estatisticamente significativas (p<0,05)

Através dos resultados obtidos, é possível verificar que tanto a bolota como a B30 exibiram valores bastante próximos ao alcançado para o controlo positivo (trolox), não apresentando diferenças estatisticamente significativas. Quanto à alfarroba, esta não obteve um valor tão baixo e próximo do trolox como a bolota, mas é possível concluir que com o aumento do grau de torra o valor de IC₅₀ diminuiu, e consequentemente a capacidade antioxidante das amostras aumenta, visto que as diferenças entre a alfarroba, A30 e A10 mostraram ser estatisticamente significativas.

Relativamente às bebidas funcionais, estas apresentaram resultados de IC₅₀ numa gama entre os valores obtidos para as matrizes, alfarroba e bolota. Entre a B1 e a B2 não existem diferenças estatisticamente relevantes, sendo que apresentaram valores mais baixos relativamente à B3. Em comparação com o CF e a CEV, as três bebidas funcionais revelaram ter mais capacidade antioxidante face à CEV e a B1 foi a bebida que se aproximou mais do valor obtido para o CF, que apresentou um valor de IC₅₀ inferior em relação à B2 e B3, mas não muito distante.

Não foram encontrados valores de IC₅₀ na literatura para a atividade de sequestro destes radicais na bolota e na alfarroba, no entanto pode-se aferir que tanto estas matrizes, nomeadamente a bolota, como as bebidas extraídas, apresentam bastante potencial antioxidante, provado pelas altas concentrações obtidas para o sequestro do DPPH[•] e do ABTS^{•+} em equivalentes de trolox e pela capacidade dos extratos em reduzir o radical ABTS^{•+} através de baixos valores de IC₅₀.

4.3. Análise da bioatividade

O consumo de alimentos ultraprocessados, excesso de bebidas alcoólicas, tabagismo e o sedentarismo estão diretamente ligados ao aumento do número de pessoas com *diabetes mellitus* tipo II e a prevalência crescente desta doença está a tornar-se uma grande preocupação de saúde pública, apresentando um problema de saúde emergente nas sociedades ocidentais.

As DCV, danos renais e neuropatia (distúrbio neurológico) são a principal causa de elevadas taxas de mortalidade entre os indivíduos com diabetes (Dirir et al., 2021). Uma abordagem terapêutica para o tratamento da diabetes é diminuir a hiperglicemia pós-prandial através da inibição de enzimas digestivas como α -glucosidase e a α -amilase pois são responsáveis pela digestão de hidratos de carbono complexos, convertendo-os em monossacarídeos simples facilmente digeríveis, como a glicose (Lopes et al., 2019). Estas enzimas desempenham o seu papel em diferentes partes do organismo nos mamíferos. A α -glucosidase é uma enzima intestinal ligada à membrana epitelial do intestino delgado que catalisa a etapa final do processo digestivo dos hidratos de carbono em glicose, enquanto a α -amilase é uma enzima que participa na digestão de duas formas, uma produzida nas glândulas salivares e outra produzida no pâncreas, catalisando a hidrólise do amido que o transforma em moléculas de açúcares mais simples como a glicose e a maltose (Assefa et al., 2019; Lopes et al., 2019).

Atualmente, alguns inibidores sintéticos de ambas as enzimas, tais como a acarbose, o miglitol e o voglibose são amplamente utilizados em clínicas para controlar os níveis de glucose no sangue dos pacientes, contudo, podem causar sintomas gastrointestinais negativos. Neste sentido, a comunidade científica tem vindo a procurar novos compostos naturais com propriedades antidiabéticas de forma a superar qualquer resistência desenvolvida pelos pacientes aos medicamentos atualmente utilizados. Idealmente, a descoberta de inibidores das enzimas α -glucosidase e a α -amilase a partir de materiais naturais, tais como matrizes alimentares, será muito útil no desenvolvimento de novos medicamentos antidiabéticos para o tratamento da diabetes e das suas complicações (Li et al., 2010).

Neste trabalho, as matrizes, as suas torrões, as bebidas produzidas e as bebidas comerciais (CF e CEV) foram analisados quanto às suas capacidades como inibidores das enzimas α -glucosidase e α -amilase com o intuito de provar o seu potencial na prevenção de DCV. Esta capacidade de inibição pode ser avaliada através do valor de IC_{50} , que é definido como o valor da concentração de um inibidor necessária para inibir 50% da atividade enzimática.

4.3.1. Inibição da α -Glucosidase

As amostras em estudo foram analisadas quanto à sua capacidade para prevenir a clivagem de hidratos de carbono complexos, através da avaliação dos seus efeitos na atividade da enzima α -glucosidase. Globalmente, todos os extratos foram capazes de inibir a α -glucosidase de forma dependente da dose, como pode ser observado na Figura 33, com os respetivos valores de IC_{50} que se encontram representados na Tabela 26. No Anexo G.1 encontram-se os gráficos independentes das amostras analisadas.

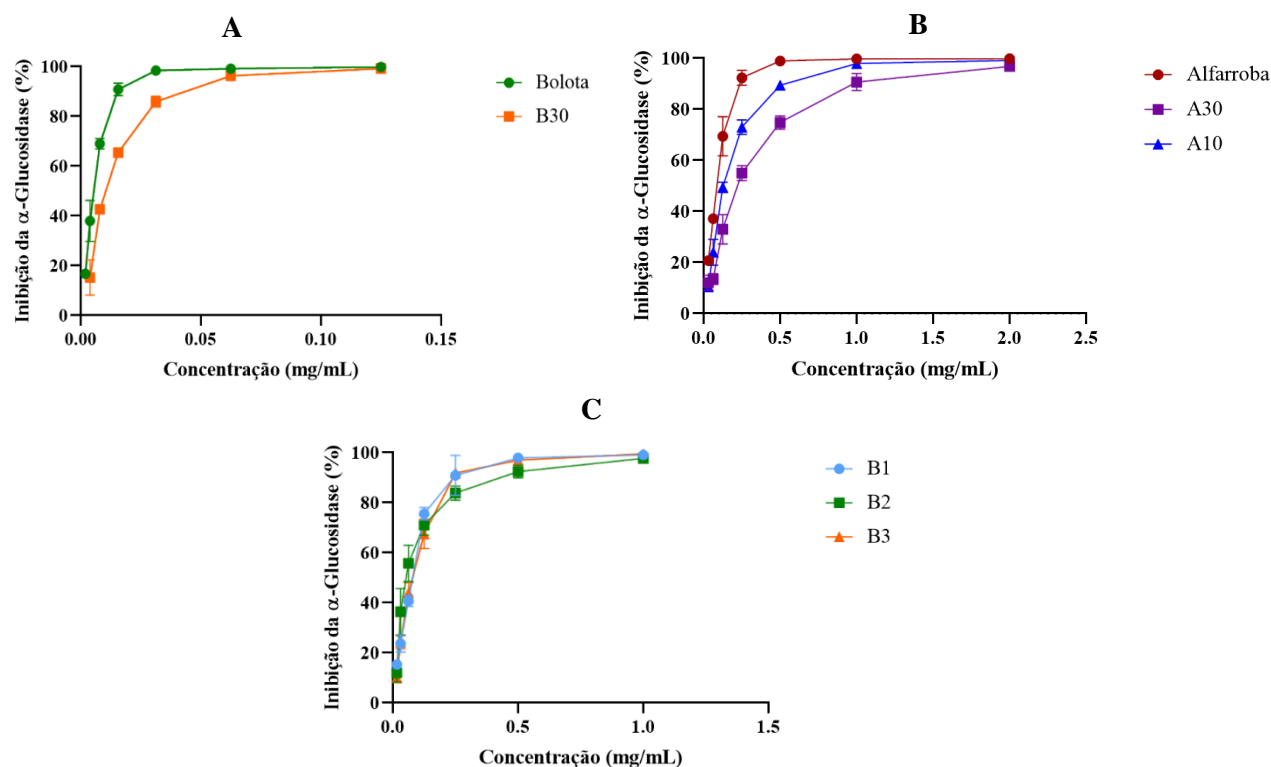


Figura 33. Inibição da α -glucosidase pelos extratos analisados: A) Bolota e B30; B) Alfarroba, A30 e A10; e C) Bebidas – B1, B2 e B3. Os resultados mostram a média \pm SEM de três experiências, realizadas em triplicado, para as amostras do gráfico B e média \pm SD de pelo menos três experiências independentes para as restantes amostras dos gráficos A e C.

Tabela 26. Inibição da α -glucosidase pelos extratos analisados e pela acarbose (controlo positivo).

IC ₅₀ (μ g/mL)	
Acarbose	304 \pm 37 ^a
Bolota	5,36 \pm 0,66 ^b
B30	10,5 \pm 0,4 ^b
Alfarroba	91,9 \pm 17,4 ^c
A30	217 \pm 41 ^d
A10	132 \pm 12 ^c
B1	79,6 \pm 3,4 ^{c,e}
B2	53,8 \pm 16,2 ^{b,e}
B3	79,8 \pm 12,5 ^{c,e}

Letras superiores à linha diferentes correspondem a diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

Nos três gráficos representados (Figura 33) é possível ver o efeito de inibição de diferentes concentrações dos extratos das amostras sólidas (gráficos A e B) e das bebidas desenvolvidas (gráfico C) sobre a α -glucosidase. De todas, a bolota foi a amostra que mais se destacou pela positiva, mostrando um maior efeito inibidor sobre esta enzima, com um $IC_{50} = 5,36 \pm 0,66 \mu\text{g/mL}$, sendo mais de 50 vezes inferior ao valor encontrado para o controlo positivo acarbose com $IC_{50} = 304 \pm 37 \mu\text{g/mL}$. As restantes amostras obtiveram também valores bastante inferiores aos da acarbose, sendo que a alfarroba e as suas torras foram as únicas com valores de IC_{50} mais próximos aos obtidos para este controlo positivo.

Relativamente às matrizes cruas, a bolota obteve uma maior capacidade de inibição sobre a α -glucosidase, tendo obtido um valor de IC_{50} cerca de 16% mais baixo comparativamente à alfarroba ($p < 0,05$). Entre as matrizes cruas e as respetivas torras, a bolota e a B30 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, assim como a alfarroba e a A10, contudo isso não aconteceu entre a alfarroba e a A30 ($p < 0,05$). Desta forma, notou-se que neste caso a A30 ($217 \pm 41 \mu\text{g/mL}$) obteve um valor maior comparativamente à A10 ($IC_{50} = 132 \pm 12 \mu\text{g/mL}$) e à alfarroba crua ($IC_{50} = 91,9 \pm 17,4 \mu\text{g/mL}$), constatando-se que tanto o processo de torra influenciou a capacidade de inibição do extrato para com a enzima α -glucosidase, sendo que quanto maior a temperatura de torra desta matriz, maior a perda da sua capacidade de inibição.

Curiosamente, não existem muitos estudos sobre o efeito inibitório da bolota e da alfarroba para com esta enzima, contudo, um estudo realizado por Güvenalp et al. (2016) investigou a atividade inibitória de extratos metanólicos de bolota da espécie *Quercus robur* L., tendo sido reportado um valor de $IC_{50} = 7,1 \mu\text{g/mL}$, bastante próximo ao obtido neste trabalho para esta matriz ($IC_{50} = 5,36 \pm 0,66 \mu\text{g/mL}$). Por outro lado, Qasem et al. (2018) reportaram um valor de $IC_{50} = 97,13 \mu\text{g/mL}$ para um extrato de polpa de alfarroba previamente extraído com metanol, um valor igualmente próximo ao obtido neste trabalho ($IC_{50} = 91,9 \pm 17,4 \mu\text{g/mL}$).

No que diz respeito às bebidas produzidas, também revelaram uma atividade inibitória bastante forte contra a α -glucosidase, um pouco mais eficazes que a acarbose. Nas três bebidas verificou-se que as diferenças não são estatisticamente significantes, visualizando-se também na quase sobreposição das suas curvas de dose-resposta.

O CF e a CEV foram também analisados, sendo que não apresentaram qualquer atividade inibitória sobre a α -glucosidase para as concentrações testadas, provando que as bebidas produzidas são claramente mais eficazes do que um café normal e do que uma cevada na inibição desta enzima.

A partir destes resultados, pode-se prever que todas as amostras estudadas em relação às matrizes e às bebidas confeccionadas possuem um valor previsto de atividade para a inibição da α -glucosidase muito maior em relação ao controlo positivo acarbose. Estes resultados são interessantes, tendo em vista os poucos estudos acerca destas matrizes e o seu potencial uso em produtos como substituto de café. Neste sentido, a inibição da α -glucosidase é um dos mecanismos envolvidos no efeito hipoglicémico da bolota e da alfarroba, assim como das bebidas preparadas.

4.3.2. Inibição da α -Amilase

A α -amilase (derivada do pâncreas de porco) foi outra enzima utilizada para avaliar o potencial das amostras estudadas em suprimir a hiperglicemia pós-prandial, através da sua capacidade de inibição. Ao contrário do que se observou na α -glucosidase, a maioria dos extratos mostraram muito pouca ou nenhuma atividade de inibição para a α -amilase.

Os gráficos das curvas de dose-resposta obtidos estão representados no Anexo G.2, sendo que se pode observar que não foi possível atingir valores de IC_{50} para nenhuma amostra em estudo, contudo obteve-se um valor de $IC_{50} = 913 \mu\text{g}/\text{mL}$ para a acarbose (controlo positivo), o que significa que o ensaio realizado funciona.

Entre todas as amostras analisadas, a bolota e a B30 foram as que mostraram algum efeito inibitório na atividade desta enzima para a concentração mais alta testada, de $1 \text{ mg}/\text{mL}$, com uma percentagem de inibição de $44,5 \pm 8,5\%$ e $38,6 \pm 15,1\%$, respetivamente. A alfarroba, a A30 e a A10 mostraram um ligeiro aumento da inibição da enzima a concentrações mais altas, sendo que esta capacidade diminuiu com o aumento do grau de torra. As bebidas preparadas e o CF e CEV não mostraram qualquer atividade de inibição.

Na literatura, não foram encontradas informações sobre a capacidade de inibição da α -amilase por parte de qualquer espécie de bolota, porém, um estudo realizado por Qasem et al. (2018) testou a inibição desta enzima com extratos de polpa de alfarroba, comprovando a sua potencial capacidade de inibição com um valor de $IC_{50} = 92,99 \mu\text{g}/\text{mL}$. Estes extratos foram obtidos através de uma extração por *Soxhlet* com metanol, sendo posteriormente determinada a inibição pelo método colorimétrico com o agente colorante DNS. A distinção no tipo de extração entre o ensaio efetuado neste trabalho e do estudo dos autores Qasem et al. (2018) pode explicar a diferença de resultados relativamente a esta análise.

Com isto, é possível aferir que os extratos preparados revelaram não ter muita capacidade de inibição da enzima α -amilase, no entanto é essencial realizar estudos adicionais de forma a testar diferentes solventes e técnicas de extração de forma verificar se conseguem atingir uma maior inibição desta enzima.

O estudo das correlações de Pearson está representado no Anexo H, onde estão presentes duas tabelas que apresentam as correlações entre todas as amostras e todas as análises efetuadas no presente trabalho.

Em relação às amostras sólidas nota-se uma correlação bastante positiva entre a inibição da enzima α -glucosidase e os minerais estudados, para o potássio ($r = 0,821$), sódio ($r = 0,886$), magnésio ($r = 0,840$), cálcio ($r = 0,893$), assim como também para o rácio Na/K ($r = 0,767$) e rácio Ca/Mg ($r = 0,890$) e para o teor de sal ($r = 0,779$); existe também uma correlação forte positiva entre a inibição da enzima e o teor de fibras insolúveis ($r = 0,917$), sendo que quando o teor de fibras aumenta, aumenta igualmente o valor de IC_{50} e diminui a capacidade de inibição da enzima. Em contrapartida, existe uma correlação negativa entre a inibição da enzima α -glucosidase e o teor de lípidos ($r = -0,815$) e proteínas ($r = -0,703$). Em relação aos produtos da reação de *Maillard*, esta enzima tem uma correlação negativa com todos os comprimentos fixos, 280 nm ($r = -0,519$), 294 nm ($r = -0,465$), 360 nm ($r = -0,860$) e 420 nm ($r = -0,878$), sendo que quanto mais produtos de *Maillard* se formam mais baixa é a inibição da enzima. Isto pode ser também evidenciado pela correlação positiva que a enzima α -glucosidase tem com os AGEs ($r = 0,927$) e os taninos condensados ($r = 0,835$).

Nas bebidas, existem duas correlações fortes entre a enzima α -glucosidase e as proteínas ($r = 0,789$) e fibras ($r = 0,807$) e tal como nas amostras sólidas. Esta enzima tem uma correlação forte negativa com todos os comprimentos fixos dos produtos da reação de *Maillard*, 280 nm ($r = -0,779$), 294 nm ($r = -0,801$), 360 nm ($r = -0,808$) e 420 nm ($r = -0,792$). Os valores de IC_{50} para esta enzima podem ser explicados também devido à correlação negativa forte com os TPC ($r = -0,787$) e os TFC ($r = -0,876$), uma vez que os compostos fenólicos são inibidores enzimáticos e é preciso uma

concentração de extrato mais pequena para inibir a enzima (Moreira, & Mancini-Filho, 2004). A correlação entre esta enzima e os taninos foi positiva indicando a influência negativa destes compostos na inibição da enzima ($r = 0,793$).

Também existem diversas correlações entre os compostos fenólicos, atividades de sequestro de radicais e produtos da reação de *Maillard*. Nas amostras sólidas, observaram-se correlações bastante positivas entre os teores de TPC e compostos de *Maillard* a 280 nm ($r = 0,962$), 294 nm ($r = 0,942$), 360 nm ($r = 0,967$) e a 420 nm ($r = 0,955$), sendo os compostos da reação de *Maillard* podem interferir com o ensaio de Folin-Ciocalteu, o que resulta em valores de TPC maiores. Como era previsto, existe também uma forte correlação entre os valores de TPC e ABTS^{•+} ($r = 0,889$) e entre o DPPH[•] ($r = 0,893$), o que significa que quando uma amostra tem alto teor em compostos fenólicos, apresenta uma capacidade maior de sequestro do radical ABTS^{•+} e DPPH[•]. Contudo, nas bebidas não se observaram estas correlações positivas, pelo que pode ser explicado pelo facto da parte solúvel que é extraída com água quente pode não ser a mais bioativa e para além disso pode haver efeitos antagónicos ou sinérgicos entre os compostos quando se misturam as amostras.

4.4. Análise sensorial hedónica

A análise sensorial efetuada às bebidas funcionais preparadas (B1, B2 e B3) teve como objetivo avaliar não só a opinião dos provadores relativamente às características organolépticas das bebidas, mas também a aceitação dos mesmos e à potencial intenção de compra face aos produtos desenvolvidos. Esta análise foi estudada por um método da escala hedónica que analisa a preferência dos consumidores por determinados produtos por meio de uma avaliação que contém uma escala de respostas previamente estabelecida.

Esta prova sensorial contou com a participação de 20 pessoas, de forma anónima, 65% do sexo feminino e 35% do sexo masculino. Destes participantes, a maioria tinha idades entre 20 a 30 anos (40%) e 31 a 40 anos (35%), sendo que apenas 20% tinha entre 41 a 50 anos e apenas um com menos de 20 anos (Figura I4, Anexo I).

No inquérito realizado, as três bebidas foram apresentadas como substitutos de café, sendo avaliadas diversas características relacionadas com a aparência, com o aroma e com o sabor, onde os provadores puderam selecionar as que fossem mais de acordo com as suas preferências pessoais.

Nas Figuras 34, 35 e 36 estão representados os resumos das respostas obtidas para as bebidas B1 (a azul), B2 (a laranja) e para a B3 (a vermelho), respetivamente.

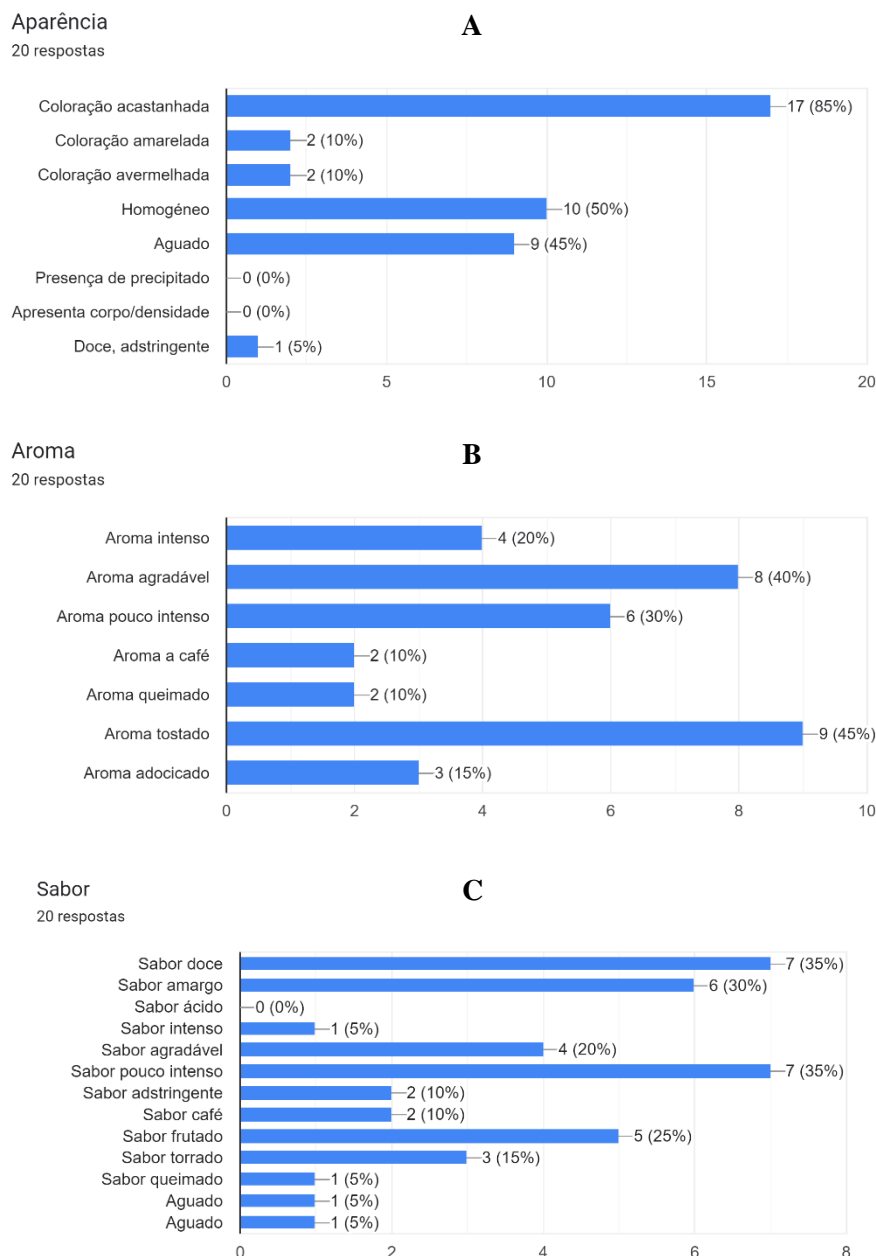


Figura 34. Resumo das respostas dadas à aparência (A), aroma (B) e sabor (C) da B1.

Relativamente à aparência, a B1 foi descrita como tendo uma coloração castanha por 85% dos provadores, também com alguma coloração amarelada e vermelha, homogênea e aguada. Quanto ao aroma a maioria dos provadores considerou o aroma agradável (40%) e pouco intenso (30%), mas também um aroma bastante tostado (45%). Em termos de sabor consideraram esta bebida doce (35%), mas com um sabor pouco intenso (35%). Cerca de 30 % também achou a bebida amarga e agradável (20%) com sabor a frutado (25%). No entanto, apenas 10% identificou a bebida adstringente e com sabor a café.

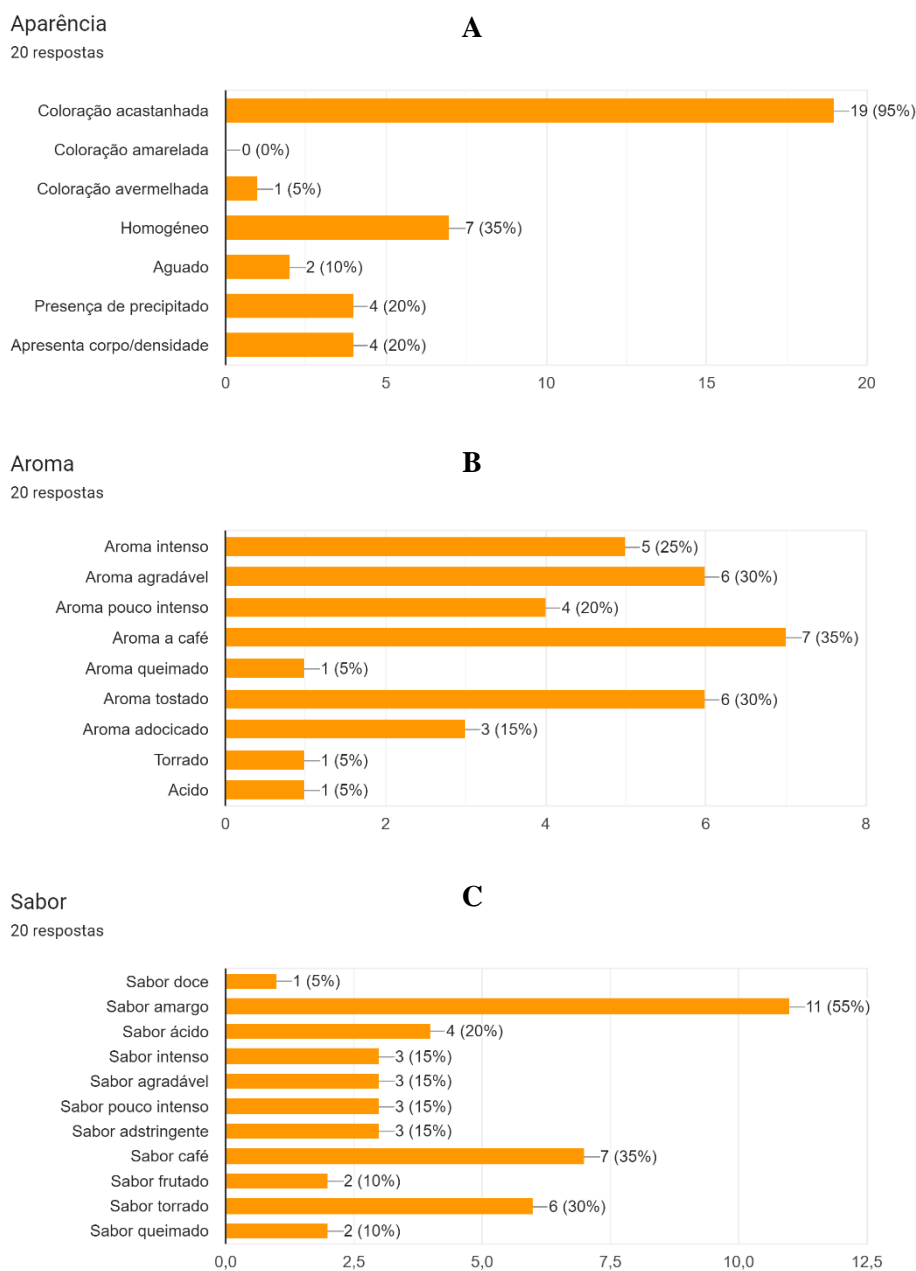


Figura 35. Resumo das respostas dadas à aparência (A), aroma (B) e sabor (C) da B2.

Quanto à amostra B2, 95% dos provadores consideraram que a bebida tinha uma coloração acastanhada. O aspeto final da bebida era homogéneo e aguado segundo 35% e 10% dos provadores, respetivamente, e 20% consideraram que havia presença de algum precipitado assim como que a bebida apresentava corpo/densidade. Em relação ao aroma cerca de 35% detetaram o aroma a café, assim como aroma a tostado (30%), achando a bebida agradável (30%). O sabor foi destacado como amargo (55%), apresentando também um sabor a café (35%) e a torrado (30%).

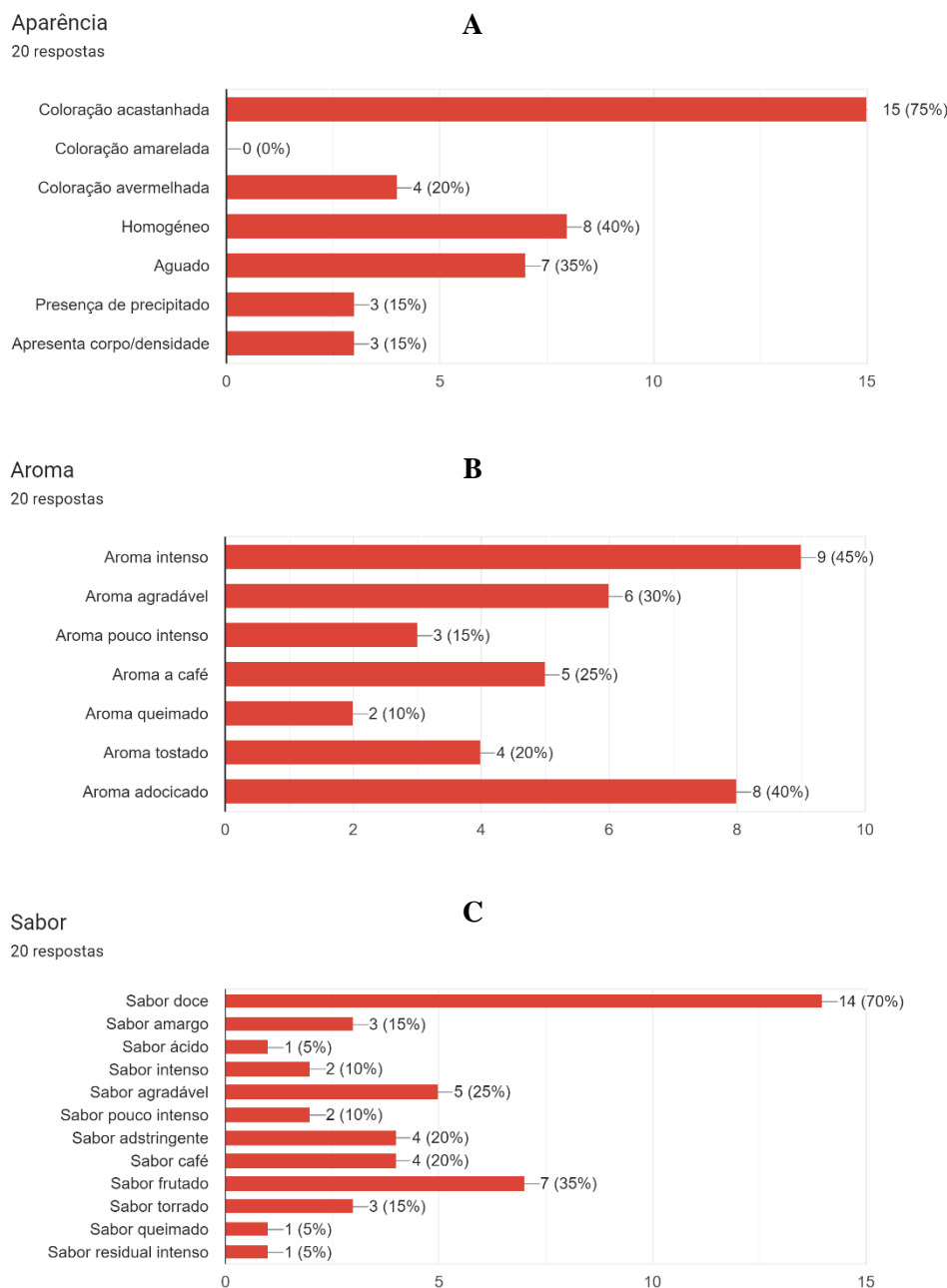


Figura 36. Resumo das respostas dadas à aparência (A), aroma (B) e sabor (C) da B3.

No que diz respeito à B3, 75% dos provadores consideraram que apresentava uma coloração acastanhada, mas também avermelhada (20%) e com um aspeto bastante homogéneo (40%) e aguado (35%). Apenas 15% verificou a presença de precipitado assim como de corpo/densidade na bebida. Em relação ao aroma, este foi considerado intenso (45%), adocicado (40%) e agradável (30%). Em termos de sabor não houve qualquer dúvida pois 70% considerou que a bebida tinha um sabor doce, adicionalmente também consideraram a bebida com sabor a frutado (35%) contendo um sabor no fim agradável (25%).

Os parâmetros de aparência, aroma e cheiro foram também avaliados através da atribuição de uma nota dada a cada um entre 1 e 9, assim como uma nota de 1 a 9 em relação à aceitação global e a

intenção de compra (1 a 5) pelos participantes, para cada bebida individualmente. As médias destes resultados encontram-se na Tabela 27.

Tabela 27. Médias das respostas dadas pelos participantes às notas de cada parâmetro organolético (aparência, aroma e sabor) e da aceitação global e intenção de compra de bebida.

	B1	B2	B3
Aparência [0– 9]	5,85 ± 1,66	6,15 ± 1,93	6,15 ± 1,69
Aroma [0– 9]	5,45 ± 1,76	5,30 ± 1,72	5,55 ± 1,96
Sabor [0– 9]	5,00 ± 1,75	5,15 ± 1,69	5,35 ± 2,06
Aceitação global da bebida [1– 9]	5,15 ± 1,76	5,35 ± 1,73	5,45 ± 1,99
Intenção de compra da bebida [1– 5]	2,45 ± 1,00	2,35 ± 0,99	2,70 ± 1,03

Não há diferenças significativas para nenhum dos parâmetros ($p > 0,05$).

Escala: [0– 9]: 9 - Gostei extremamente; 8 - Gostei muito; 7 - Gostei moderadamente; 6 - Gostei ligeiramente; 5 - Não gostei nem desgostei; 4 - Desgostei ligeiramente; 3 - Desgostei moderadamente; 2 - Desgostei muito; 1 - Desgostei extremamente. Escala: [1– 5]: 5 - Com certeza compraria; 4 - Provavelmente compraria; 3 - Não sei; 2 - Provavelmente não compraria; 1 - Com certeza não compraria.

Pela análise da tabela 27, podemos verificar as preferências dos provadores a nível geral para cada bebida dada a degustar de forma individual. Quanto à aparência todas as amostras se aproximam da nota 6 “gostei ligeiramente”, o que significa que os provadores gostaram apenas ligeiramente de uma forma geral da aparência das bebidas, mas é de notar que a B1 teve uma pontuação mais baixa, sendo que gostaram mais do aspeto da B2 e B3. Já no caso do aroma, do sabor e da aceitação global são todos próximos de 5 “ Não gostei nem desgostei “, o que significa que os provadores se sentiram mais indiferentes relativamente a estes três parâmetros. No entanto gostaram mais do aroma e do sabor de bebida B3, tendo tido esta uma pontuação média mais alta relativamente às restantes.

Nas Tabelas 28, 29 e 30 pode-se observar as correlações entre os diferentes parâmetros analisados para a B1, B2 e B3, respetivamente.

Tabela 28. Correlação entre os diferentes parâmetros analisados para a B1.

B1	Matriz de correlação inter-item				
	Aparência	Aroma	Sabor	Aceitação global	Intenção de compra
Aparência	1,00	0,671	0,706	0,801	0,645
Aroma	0,671	1,00	0,667	0,760	0,597
Sabor	0,706	0,667	1,00	0,927	0,845
Aceitação global	0,801	0,760	0,927	1,00	0,830
Intenção de compra	0,645	0,597	0,845	0,830	1,00

De acordo com os resultados da Tabela 28, é possível observar que existe uma correlação alta entre a aceitação global e os atributos de aparência, aroma e sabor, sendo que o sabor obteve a correlação mais alta das três, seguido da aparência e por fim o aroma. É possível também analisar que tanto a aceitação global como a intenção de compra têm ambas uma correlação mais alta com o sabor, sendo os provadores gostaram mais do sabor desta bebida relativamente aos restantes atributos.

Tabela 29. Correlação entre os diferentes parâmetros analisados para a B2.

B2	Matriz de correlação inter-item				
	Aparência	Aroma	Sabor	Aceitação global	Intenção de compra
Aparência	1,00	0,764	0,509	0,537	0,524
Aroma	0,764	1,00	0,670	0,708	0,523
Sabor	0,509	0,670	1,00	0,971	0,753
Aceitação global	0,537	0,708	0,971	1,00	0,727
Intenção de compra	0,524	0,523	0,753	0,727	1,00

Na B2, observa-se que existe uma forte correlação entre o aroma e a aparência, mas existe uma correlação ainda mais forte entre o sabor e a aceitação global, sendo que os provadores voltaram a preferir o sabor a todos os outros atributos, em termos de aceitação global e também de intenção de compra.

Tabela 30. Correlação entre os diferentes parâmetros analisados para a B3.

B3	Matriz de correlação inter-item				
	Aparência	Aroma	Sabor	Aceitação global	Intenção de compra
Aparência	1,00	0,592	0,769	0,761	0,810
Aroma	0,592	1,00	0,772	0,744	0,607
Sabor	0,769	0,772	1,00	0,976	0,821
Aceitação global	0,761	0,744	0,976	1,00	0,815
Intenção de compra	0,810	0,607	0,821	0,815	1,00

Por fim, na B3 a correlação maior entre os parâmetros foi entre o sabor e a aceitação global seguido da correlação entre o sabor e a intenção de compra. Por outro lado, observa-se também uma forte correlação entre a intenção de compra e a aparência da bebida, sendo que neste caso a aparência foi um dos fatores chave para os provadores terem escolhido uma alta intenção de compra.

Em suma, a nível de aceitação global os participantes preferiram a bebida B3 (mais doce), detendo também de uma intenção de compra mais alta, seguido da B2 (mais amarga) e por último a B1 (nem muito doce nem muito amarga), no entanto a intenção de compra foi ligeiramente maior para a B1 do que para a B2.

No final da avaliação individual realizada às características de cada bebida foi também questionado aos provadores se as bebidas necessitariam de ser adoçadas. A nível global os provadores acharam que não havia muita necessidade de as bebidas serem adoçadas e a bebida que obteve mais votos para ser adoçada foi a B2 (20%), seguida da B1 com (15%), sendo que para a B3 não houve ninguém a achar que precisaria de se adicionar açúcar. Consequentemente, como era expectável, a B3 obteve 95% dos votos em que não precisaria de ser adoçada e na B2 metade dos provadores acharam que poderiam adoçar mais a bebida, sendo que 30% mostraram-se indecisos quanto a esta questão. Complementarmente, 60% dos provadores afirmaram que a B1 não precisaria de ser adoçada e 15% escolheram que talvez fosse necessário.

Neste inquérito realizado foram recolhidas outras informações adicionais relativas ao consumo de café e de substitutos de café por parte dos provadores. De todos os que participaram, cerca de 80% era consumidor de café e cerca de 81,3% revelou não adoçar o café, o que significa que grande parte dos que consomem café possivelmente teriam preferência por um café mais amargo. Por outro lado, a maioria dos participantes costuma consumir café diariamente, cerca de 81,3%, e 12,5% consome duas a três vezes por semana. Constatou-se igualmente que pouco mais de metade (55%) dos participantes consome bebidas alternativas ao café, tendo preferências pela cevada, café com leite e cappuccino, sendo que apenas 27,3% consome estas bebidas diariamente.

No fim, realizou-se uma última questão sobre se comprariam ou não uma bebida funcional substituta de café, pelo que apenas metade respondeu que sim e 30% permaneceu na dúvida, o que significa que ainda existe alguma preferência pelo consumo de bebidas com cafeína ou ainda pouca abertura por parte dos consumidores para ingerirem produtos alternativos. Contudo, na globalidade, as

bebidas desenvolvidas mostraram ter boas características organolépticas, algumas até semelhantes a um café, mas não obtiveram grande aceitação por parte dos participantes, sendo que é essencial no geral melhorar a aparência, o aroma e o sabor das bebidas.

5. Conclusões

As DCV em particular as doenças cardíacas isquémicas e os AVC, são a principal causa de mortalidade global constituindo um importante obstáculo ao desenvolvimento humano sustentável. Neste sentido, a melhor forma de prevenir as DCV é controlar e diminuir os fatores de risco com a adoção de medidas preventivas a estilos de vida mais saudáveis. De entre as propostas de inovação alimentar a favor da saúde humana e da sustentabilidade do sistema produtivo, salientam-se as linhas de investigação com foco na procura de novas fontes alimentares ou no desenvolvimento de estratégias de valorização e aproveitamento das mesmas. Deste modo, recursos naturais tais como a bolota e a alfarroba apresentam-se como uma fonte alimentar alternativa bastante atraente, nativa de Portugal, com claros benefícios nutricionais e ecológicos.

O presente trabalho teve como principal objetivo desenvolver e analisar um substituto de café funcional a partir do processamento das nozes das bolotas e da polpa de alfarrobas, de forma a verificar as suas propriedades nutricionais e validar os seus potenciais benefícios na prevenção de DCV.

Os resultados referentes à composição química e nutricional das amostras sólidas mostraram que tanto a bolota como a alfarroba e as respetivas torras, possuem altos teores em fibras insolúveis, cerca de $19,0 \pm 2,5\%$ para a bolota e $31,3 \pm 4,0\%$ para a alfarroba, valores mais altos comparativamente aos encontrados em outros frutos secos como a castanha, a amêndoa e a avelã. No entanto, possuem baixo conteúdo proteico e lipídico e alto teor em açúcares, nomeadamente a alfarroba ($24,8 \pm 0,5\%$) que se destacou em relação à bolota ($5,42 \pm 0,52\%$). Apesar do baixo teor em proteínas, observou-se que apenas uma pequena percentagem (2 – 3%) das proteínas totais são proteínas solúveis em todas as amostras analisadas. Averiguou-se também que a torra pouco alterou a composição química e nutricional destas amostras sólidas, sendo que se notou que o aumento da temperatura durante o processamento fez com que as matrizes perdessem o teor em açúcar na sua composição, devido à degradação térmica dos mesmos durante o processamento térmico.

Em relação à composição química e nutricional das bebidas funcionais desenvolvidas, concluiu-se que não houve diferenças significativas entre os valores obtidos para os lípidos e para as fibras insolúveis. Por outro lado, a B2 (maioritariamente constituída por bolota, que também tem um mais baixo conteúdo em proteína) apresentou um teor em proteínas solúveis inferior à B1 e B3. Quanto aos açúcares as bebidas produzidas mostraram ter mais conteúdo em açúcar comparativamente ao CF analisado. No entanto, as bebidas mostraram ter níveis de proteína e fibras semelhantes a um café normal.

Na análise ao conteúdo mineral presente nas amostras, averiguou-se que a nível geral as amostras de alfarroba contém maiores teores de cálcio, potássio, magnésio e sódio quando comparado com a bolota. No entanto, concluiu-se que as bebidas pouco contribuem para a ingestão diária de minerais, devido aos seus baixos teores nos minerais analisados, mas poderão ser incluídos numa alimentação diversificada. Contudo, a B3 foi a bebida que apresentou maior conteúdo mineral na sua composição e apresentou também teores em cálcio, magnésio e sódio superiores ao CF e à CEV. Os teores de sal presentes em todas as amostras foram inferiores à dose máxima recomendada (5 g/dia) e na globalidade tendo em conta os rácios obtidos, estes encontram-se dentro de uma gama razoável dos valores recomendados, o que significa que não se encontram associados a um maior risco de desenvolver DCV.

A nível calórico, as três bebidas apesar de terem apresentados valores energéticos superiores ao CF e CEV analisados, continuam a ser consideradas muito pouco calóricas, o que ajuda a reduzir o risco de DCV quando consumidas.

No que concerne à atividade antioxidante, constatou-se que a nível geral todas as amostras apresentam uma alta capacidade antioxidante. Em relação aos compostos fenólicos analisados, verificou-se que tanto as amostras sólidas como as bebidas desenvolvidas são constituídas maioritariamente por flavonoides, apresentando menor quantidade em taninos condensados. Neste sentido, verificou-se que com a torra da bolota (B30) e com o aumento das torras efetuadas à alfarroba (A30 e A10), o teor destes compostos aumentou relativamente às respetivas matrizes cruas, sendo que a B30 foi a que obteve um valor maior, cerca de 2729 ± 22 mg EAG /100 g. Em relação ao TFC, todas os valores obtidos das amostras sólidas mostraram não ter diferenças estatisticamente significativas, o que significa que não houve formação de novos compostos flavonoides com a torra das matrizes. No entanto, nota-se um aumento do teor de taninos nas amostras torradas, devido presumivelmente à formação de compostos antioxidantes da reação de *Maillard*. Quanto aos resultados obtidos para as bebidas funcionais, verificou-se que B2 é a bebida funcional com maior teor em compostos fenólicos, seguido da B1 e por último a B3, tendo todas valores superiores aos obtidos para a CEV.

Relativamente aos produtos da reação de *Maillard*, verificou-se ligeiras alterações no perfil dos espectros medidos antes e após a torra, o que significa que ocorreram mudanças nos produtos formados durante o processamento térmico. Através da análise do índice de acastanhamento, dos produtos intermediários e dos compostos da fase final da reação, constatou-se que comparando as torras, a B30 foi a que mostrou uma maior quantidade de compostos de cor (acastanhamento), e também de outros produtos formados pela reação, como os produtos intermediários e os produtos finais como as melanoidinas. No que diz respeito às bebidas funcionais, os resultados mostraram que na generalidade estas apresentam menos produtos formados pela reação de *Maillard* em comparação com o CF e a CEV. Segundo os AGEs identificados nas amostras, concluiu-se que conteúdo de AGEs fluorescentes nas matrizes foi bastante inferior às amostras torradas, significando que o risco na saúde pode aumentar com o aumento da temperatura a que o alimento está sujeito. Por outro lado, verificou-se uma correlação entre o pH e a formação de compostos de *Maillard* sendo que com o aumento do grau de torra observou-se uma diminuição do pH.

Ainda na análise à atividade antioxidante das amostras em estudo, os resultados demonstraram que os todos os extratos analisados têm maior capacidade de sequestro do radical ABTS^{•+} comparativamente ao radical DPPH[•]. A bolota ($2,86 \pm 0,11$ mg ET/100 g) foi a matriz que apresentou maior poder antioxidante para esta análise, sendo que as bebidas desenvolvidas obtiveram valores superiores aos encontrados para o CF. Os valores de IC₅₀ encontrados para a atividade de sequestro do radical ABTS^{•+} foram muito bons em todas as amostras, sendo os da bolota e da B30 os mais próximos ao alcançado para o trolox (controlo positivo). Adicionalmente, concluiu-se que com o aumento do grau de torra o valor de IC₅₀ diminuiu, o que leva a uma maior capacidade antioxidante da amostra, aferindo que neste caso as amostras torradas ganharam um maior potencial antioxidante com o processamento.

No estudo efetuado à bioatividade, todas as amostras mostraram os seus potenciais como agentes antidiabéticos, uma vez que os extratos mostraram uma forte inibição da α -glucosidase em comparação com a acarbose (controlo positivo). De todas, a bolota foi a amostra que mais se destacou pela positiva, mostrando um maior efeito inibidor sobre esta enzima, com um IC₅₀ = $5,36 \pm 0,66$ μ g/ mL e as bebidas apresentaram um IC₅₀ = $79,6 \pm 3,4$ μ g/ mL para a B1, IC₅₀ = $53,8 \pm 16,2$ μ g/ mL para a B2 e IC₅₀ = $79,8 \pm 12,5$ μ g/ mL para a B3. Por outro lado, não foram registadas quaisquer inibições para a α -amilase.

Através da análise sensorial realizada, concluiu-se que os provadores tiveram mais preferência pela bebida B3 (mais doce), de seguida da B2 (mais amarga) e por último a B1 (nem muito doce nem muito amarga). Apesar de os provadores terem mostrado que não tinham muita intenção de comprar alguma das bebidas, a B3 foi a que obteve um valor maior.

Como trabalho futuro, sugere-se essencialmente melhorar o produto final de forma a otimizar as suas características organoléticas com maior impacto na intenção de compra: aparência e sabor. Tendo em conta os consumidores de café também se pretende desenvolver uma bebida mais parecida com o café nomeadamente em relação ao corpo e densidade e que seja possível preparar como um café expresso. Também se pretende estudar o tempo de prateleira dos produtos e a sua estabilidade.

Lista de Referências

- Adeoti, I. A., & Hawboldt, K. (2014). A review of lipid extraction from fish processing by-product for use as a biofuel. *Biomass and Bioenergy*, 63, 330-340.
- Ahmed, F., & Iqbal, M. (2018). Antioxidant activity of *Ricinus communis*. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, 5(4), 107-112.
- Aibar-Guzmán, B., García-Sánchez, I. M., Aibar-Guzmán, C., & Hussain, N. (2022). Sustainable product innovation in agri-food industry: Do ownership structure and capital structure matter?. *Journal of Innovation & Knowledge*.
- Akoglu, H. (2018). User's guide to correlation coefficients. *Turkish journal of emergency medicine*, 18(3), 91-93.
- Aliyu, A. O., Faruruwa, M. D., & Abdu, A. H. (2015). Seasonal evaluation of mineral elements, heavy metals, essential amino acids, proximate compositions and pesticides in goat milk. *World J. Analy. Chem*, 3(1), 1-9.
- Alvarez, L. P. S. (2013). *A alfarroba como fonte de ingredientes bioativos: fibra alimentar, polifenóis e ciclotois*. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.
- Alves, M. F. F. R. (2019). *Relação entre o consumo de antioxidantes e as doenças cardiovasculares* (Master's thesis).
- Amini, M., Zayeri, F., Salehi, M. (2021). Trend analysis of cardiovascular disease mortality, incidence, and mortality-toincidence ratio: results from global burden of disease study 2017. *BMC Public Health*.
- Andrés-Bello, A., Barreto-Palacios, V. I. V. I. A. N., García-Segovia, P., Mir-Bel, J., & Martínez-Monzó, J. (2013). Effect of pH on color and texture of food products. *Food Engineering Reviews*, 5(3), 158-170.
- AOAC (2005). AOAC-Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis of AOAC International 18th ed. Gaithersburg, Maryland, USA.
- AOAC. (2000). Official methods of analysis of AOAC. International 17th edition; Gaithersburg, MD, USA. Association of Analytical Communities
- ASAE. (2009). Perigos de Origem Alimentar. Disponível em <https://www.asae.gov.pt/cientifico-laboratorial/area-tecnico-cientifica/perigos-de-origem-alimentar.aspx> (Acedido a 02/12/2021)
- Assefa, S. T., Yang, E. Y., Chae, S. Y., Song, M., Lee, J., Cho, M. C., & Jang, S. (2019). Alpha glucosidase inhibitory activities of plants with focus on common vegetables. *Plants*, 9(1), 2.
- Avallone, R., Plessi, M., Baraldi, M., & Monzani, A. (1997). Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannins. *Journal of food composition and analysis*, 10(2), 166-172.
- Avallone, R., Plessi, M., Baraldi, M., & Monzani, A. (1997). Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannins. *Journal of food composition and analysis*, 10(2), 166-172.

- Ayaz, F. A., Torun, H., Ayaz, S. E. M. A., Correia, P. J., Alaiz, M., Sanz, C., ... & Strnad, M. (2007). Determination of chemical composition of anatolian carob pod (*Ceratonia siliqua* L.): sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds. *Journal of Food Quality*, 30(6), 1040-1055.
- Aydın, S., & Özdemir, Y. (2017). Development and characterization of carob flour based functional spread for increasing use as nutritious snack for children. *Journal of Food Quality*
- Babista, P., & Saraiva, J. (2003). Higiene Pessoal na Indústria Alimentar. *Forvisão*.
- Barroso, M. F., Ramalhosa, M. J., Alves, R. C., Dias, A., Soares, C. M., Oliva-Teles, M. T., & Delerue-Matos, C. (2016). Total antioxidant capacity of plant infusions: Assessment using electrochemical DNA-based biosensor and spectrophotometric methods. *Food Control*, 68, 153-161.
- Batlle, I., & Tous, J. (1997). Carob tree. *Ceratonia siliqua*,
- Benchikh, Y., & Louailèche, H. (2014). Effects of extraction conditions on the recovery of phenolic compounds and in vitro antioxidant activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pulp. *Acta Botanica Gallica*, 161(2), 175-181.
- Bento, I. D. S. B. P. (2020). Valorização de sistemas de elevado valor natural: potencialidades da bolota do montado. *Universidade de Lisboa*
- Bernaud, F. S. R., & Rodrigues, T. C. (2013). Fibra alimentar: ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 57, 397-405.
- Boublenza, I., Lazouni, H. A., Ghaffari, L., Ruiz, K., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2017). Influence of roasting on sensory, antioxidant, aromas, and physicochemical properties of carob pod powder (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Food Quality*, 2017.
- Bourbon, M., Miranda, N., Vicente, A., Rato, Q. (2016). Doenças cardiovasculares. *Instituto Nacional de Saúde*.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brennan, J. G. (2006). *Food Processing Handbook*.
- Bruno, M. F. S. (2017). *Avaliação dos requisitos de higiene e segurança alimentar em estabelecimentos do distrito de Beja*. Instituto politécnico de Beja.
- Budryn, G., Nebesny, E., Podsędek, A., Żyżelewicz, D., Materska, M., Jankowski, S., & Janda, B. (2009). Effect of different extraction methods on the recovery of chlorogenic acids, caffeine and Maillard reaction products in coffee beans. *European Food Research and Technology*, 228(6), 913-922.
- Camp, G. (2014). Cardiovascular disease prevention. *Acta Clinica Belgica*.
- Cannon, K. J., & Flores, R. A. (2014). Keys to Understanding and Addressing Consumer Perceptions and Concerns about Processed Foods.
- CCDR-N. (2020). Economia circular - Agenda Regional do Norte. *Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional Do Norte*
- Codex Alimentarius. (2016). Higiene dos Alimentos-Textos Básicos.

- Coelho, M., Silva, S., Rodríguez-Alcalá, L. M., Oliveira, A., Costa, E. M., Borges, A., Martins, C., Rodrigues, A. & Pintado, M. M. E. (2018). Quercus based coffee-like beverage: effect of roasting process and functional characterization. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(1), 471-479.
- Coelho, M., Silva, S., Rodríguez-Alcalá, L. M., Oliveira, A., Costa, E. M., Borges, A., Martins, C., Rodrigues, A. & Pintado, M. M. E. (2018). Quercus based coffee-like beverage: effect of roasting process and functional characterization. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(1), 471-479.
- Correia, L. F. M., Faraoni, A. S., & Pinheiro-Sant'Ana, H. M. (2008). Efeitos do processamento industrial de alimentos sobre a estabilidade de vitaminas. *Alimentos e Nutrição Araraquara*.
- Correia, P. R., Leitão, A. E., & Beirão-da-Costa, M. L. (2009). Effect of drying temperatures on chemical and morphological properties of acorn flours. *International journal of food science & technology*, 44(9), 1729-1736.
- Cosmulescu, S., Trandafir, I., & Nour, V. (2017). Phenolic acids and flavonoids profiles of extracts from edible wild fruits and their antioxidant properties. *International Journal of Food Properties*, 20(12), 3124-3134.
- Costa, M. D. R. L. D. (2014). *Development and characterization of new functional acorn beverage*.
- Crittenden, A. N., & Schnorr, S. L. (2017). Current views on hunter-gatherer nutrition and the evolution of the human diet. *American Journal of Physical Anthropology*, 162, 84-109.
- Cruz, I. D. S. (2018). Desenvolvimento de novos produtos: bolachas de farinha de bolota e arroz com frutos vermelhos e castanha do Brasil. *Instituto Politécnico de Santarém*.
- Cunha, A. R., Umbelino, B., Correia, M., & Neves, M. (2011). Efeitos do magnésio sobre a estrutura e função vascular. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto (TÍTULO NÃO-CORRENTE)*, 10(3).
- Da Silva, E. F. (2009). Utilização da farinha da alfarroba (*Ceratonia siliqua* L.) na elaboração de bolo e avaliação de aceitação por testes sensoriais afetivos. *Seminário Científico de Nutrição*.
- Dangkulwanich, M., Kongnithigarn, K., & Aurnoppakhun, N. (2018). Colorimetric measurements of amylase activity: Improved accuracy and efficiency with a smartphone. *Journal of Chemical Education*, 95(1), 141-145.
- Daso, A. P., & Okonkwo, O. J. (2015). Conventional Extraction Techniques: Soxhlet and Liquid-Liquid Extractions and Evaporation. *Analytical Separation Science*, 1437-1468.
- De Vasconcelos, M. C., Bennett, R. N., Rosa, E. A., & Ferreira-Cardoso, J. V. (2010). Composition of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and association with health effects: fresh and processed products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), 1578-1589.
- Decreto-Lei 54/2010. <https://dre.tretas.org/dre/275090/decreto-lei-54-2010-de-28-de-maio>.
- DGS. (2006). Programa nacional de prevenção e controlo das doenças cardiovasculares. *Direção-Geral da Saúde*.
- Díaz-Fernández, P. M., Climent, J., & Gil, L. (2004). Biennial acorn maturation and its relationship with flowering phenology in Iberian populations of *Quercus suber*. *Trees*.

- Dirir, A. M., Daou, M., Yousef, A. F., & Yousef, L. F. (2021). A review of alpha-glucosidase inhibitors from plants as potential candidates for the treatment of type-2 diabetes. *Phytochemistry Reviews*, 1-31.
- Duarte, I. A. C. (2018). *Avaliação do potencial bioativo de produtos de alfarrobeira, Ceratonia siliqua L.*
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Fred, S. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Eertmans, F., Bogaert, V., Van Poecke, T., & Puype, B. (2014). An Improved Neutral α -Glucosidase Assay for Assessment of Epididymal Function—Validation and Comparison to the WHO Method. *Diagnostics*, 4(1), 1-11.
- ENEI. (2013). Diagnóstico de Apoio às Jornadas de Reflexão Estratégica. *Estratégia nacional de investigação e inovação para uma especialização inteligente 2014-2020*.
- Eurostat. (2019). Causes and occurrence of deaths in the EU. Disponível em <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/ddn-20190716-1> (Acedido a 30/11/2021)
- Evers, J. M., & Hughes, C. G. (2002). ANALYSIS / Chemical Analysis. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 34–40.
- Ezequiel, K. (2021). Quercus: a grande diversidade de carvalhos em Portugal. Florestas.pt. Disponível em <https://florestas.pt/conhecer/quercus-a-grande-diversidade-de-carvalhos-em-portugal/> (Acedido a 09/05/2022)
- FAO. (2019). Moving forward on food loss and waste reduction. The State of Food and Agriculture 2019.
- Ferreira, M. S. G. (2015). *Extração e Valorização de Compostos Fenólicos na Indústria Corticeira* (Doctoral dissertation, Universidade da Beira Interior (Portugal)).
- Ferreras, J. M., Clemencia, M. C. M., Hizon-Fradejas, A., Uy, L. Y., & Torio, M. A. (2021). Isolation, purification and characterization of proteins in “señorita” banana (*Musa acuminata* (AAA) ‘Señorita’) pulp with bioactive peptides exhibiting antihypertensive and antioxidant activities. *Applied Sciences*, 11(5), 2190.
- Figueiredo, H. R., & Carvalho, V. R. J. D. (2015). Alimentos funcionais: Compostos bioativos e seus efeitos benéficos à saúde. *Congresso Internacional do Grupo Unis. Fundação de Ensino e Pesquisa do Sul de Minas*.
- FIPA. (2019). Um compromisso nacional para a indústria agroalimentar. *Prioridades Estratégicas. FIPA*.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497-509.
- Folch, J., Less, M., & Sloane, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biology and Chemistry*, 226, 497–509
- FoodDrinkEurope. (2020). Data & trends of the european food and drink industry 2020. Disponível em <https://www.fooddrinkeurope.eu/resource/data-trends-of-the-european-food-and-drink-industry-2020/> (Acedido a 29/01/2022)

- Francisquini, J. D. A., Martins, E., Silva, P. H. F., Schuck, P., Perrone, Í. T., & Carvalho, A. F. (2017). Reação de *maillard*: uma revisão. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 72(1), 48-57.
- Frija, S. N. (2012). Alterações nutricionais, organolépticas e de textura dos produtos hortícolas conservados—Uma revisão.
- Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26, 68-87
- GlobalTrade. (2020). Portugal and Italy Remain the Largest Carob Markets Worldwide. Disponível em <https://www.globaltrademag.com/portugal-and-italy-remain-the-largest-carob-markets-worldwide/> (Acedido a 27/01/2022)
- Gomes, I., Rodrigues, H., Rodrigues, C., Marques, M., Paíga, P., Paiva, A., ... & Grosso, C. (2022). Evaluation of the biological potential of *Himantalia elongata* (L.) SF Gray and *Eisenia bicyclis* (Kjellman) Setchell subcritical water extracts. *Foods*, 11(5), 746.
- Greenfield, H., & Southgate, D. A. (2003). *Food composition data: production, management, and use*. Food & Agriculture Organization of the United Nations.
- Gregório, M. J., Guedes, L., & Sousa, S. (2019). Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável 2018/2019
- Guilherme, S. A. B. (2006). Segurança alimentar em unidades de restauração escolares. *Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação*.
- Güvenalp, Z., Yuca, H., Gözcü, S., Dursunoğlu, B., Tosun, F., & Demirezer, L. Ö. (2016). In vitro α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities of acorn, acorn shell and cupule extracts of *Quercus robur* L. *Planta Medica*, 82(S 01), P180.
- Henriques, E. C. P. (2015). *Revisão documental do Sistema de Gestão de Qualidade e Segurança Alimentar numa produção de gelado artesanal*. Universidade de Lisboa.
- Herald, T. J., Gadgil, P., Perumal, R., Bean, S. R., & Wilson, J. D. (2014). High-throughput micro-plate HCl–vanillin assay for screening tannin content in sorghum grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(10), 2133-2136.
- Hewavitharana, G. G., Perera, D. N., Navaratne, S. B., & Wickramasinghe, I. (2020). Extraction methods of fat from food samples and preparation of fatty acid methyl esters for gas chromatography: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(8), 6865-6875.
- Hofmann, J., Jung, F., Wiacek, C., Braun, P. G., Luck-Sikorski, C., & Riedel-Heller, S. G. (2018). Functional foods with cardioprotective effects. An analysis of willingness to pay in the German general population. *Ernahrungs Umschau*.
- INE. (2021). Mortes por enfarte agudo do miocárdio diminuíram 7,5% – Causas de morte 2019 (Dados provisórios).
- IPL. (2014). Código de boas práticas de higiene e segurança alimentar. Serviços de ação social do instituto politécnico de leiria.
- Jung, H., Lee, Y. J., & Yoon, W. B. (2018). Effect of moisture content on the grinding process and powder properties in food: A review. *Processes*, 6(6), 69.

- Lemos, A. C., Scaglioni, P. T., de Borba, V. S., & Furlong, E. B. (2020). Contaminantes formados durante o processamento de alimentos.
- Li, C., Feng, J., Huang, W. Y., & An, X. T. (2013). Composition of polyphenols and antioxidant activity of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) in Nanjing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(3), 523-531.
- Li, D. Q., Qian, Z. M., & Li, S. P. (2010). Inhibition of three selected beverage extracts on α -glucosidase and rapid identification of their active compounds using HPLC-DAD-MS/MS and biochemical detection. *Journal of agricultural and food chemistry*, *58*(11), 6608-6613.
- Lopes, G., Barbosa, M., Andrade, P. B., & Valentão, P. (2019). Phlorotannins from Fucales: Potential to control hyperglycemia and diabetes-related vascular complications. *Journal of Applied Phycology*, *31*(5), 3143-3152.
- López-Bascón, M. A., & Luque de Castro, M. D. (2020). *Soxhlet Extraction. Liquid-Phase Extraction*, 327–354.
- Lordan, S., Smyth, T. J., Soler-Vila, A., Stanton, C., & Ross, R. P. (2013). The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food chemistry*, *141*(3), 2170-2176.
- Loullis, A., & Pinakoulaki, E. (2018). Carob as cocoa substitute: a review on composition, health benefits and food applications. *European Food Research and Technology*, *244*(6), 959-977.
- Louro, P. I. R. (2014). *Avaliação e Caracterização da Ação Inibitória de Íminociclitolis na Atividade Alfa-Glucosidase de Células de Mamífero* (Doctoral dissertation, Universidade de Evora (Portugal)).
- Magalhães, L. (2012). Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares –Enquadramento macroeconómico da indústria Agro-Alimentar em Portugal. *Deloitte*.
- Marc, R. A., Niculae, M., Páll, E., Mureşan, V., Mureşan, A., Tanislav, A., Puscas, A., Muresan, C. & Cerbu, C. (2021). Red Oak (*Quercus rubra* L.) Fruits as Potential Alternative for Cocoa Powder: Optimization of Roasting Conditions, Antioxidant, and Biological Properties. *Forests*, *12*(8), 1088.
- Marc, R. A., Niculae, M., Páll, E., Mureşan, V., Mureşan, A., Tanislav, A., Puscas, A., Muresan, C. C. & Cerbu, C. (2021). Red Oak (*Quercus rubra* L.) Fruits as Potential Alternative for Cocoa Powder: Optimization of Roasting Conditions, Antioxidant, and Biological Properties. *Forests*, *12*(8), 1088.
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.-I., & Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, *339*, 69–72.
- Mathers, C. & Loncar. (2005). *Updated projections of global mortality and burden of disease, 2002-2030: data sources, methods and results*. World Health Organization.
- Miller, D. D. (2017). Minerals. In *Fennema's food chemistry* (pp. 627-679). CRC Press.
- Miranda, R. M. D. S. (2018). *Formulação de uma bebida à base de soro de leite com péptidos bioativos*.
- Morales, F. J. (2008). Hydroxymethylfurfural (HMF) and related compounds. *Process-induced food toxicants: Occurrence, formation, mitigation and health risks*, 135-174.
- Moreira, A. V. B., & Mancini-Filho, J. (2004). Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. *Revista de Nutrição*, *17*, 411-424.

- Moreira, J. C. H. (2012). Agentes fitoquímicos da *Persea Americana* Mill. e seu potencial contributo na dermatocósmética. *Universidade Fernando Pessoa*.
- Nafiu, M. O., Hamid, A. A., Muritala, H. F., & Adeyemi, S. B. (2017). *Preparation, Standardization, and Quality Control of Medicinal Plants in Africa. Medicinal Spices and Vegetables from Africa, 171–204*.
- Nielsen, S. S. (2010). Food analysis fourth edition. *Food Analysis*.
- Oliveira, H. D. S., & Cardoso, P. R. (2010). Atitudes e hábitos de consumo de alimentos funcionais: um estudo exploratório.
- OPAS. (2019). *Tecnologias de conservação aplicadas à segurança de alimentos*. Organização Pan-Americana da Saúde.
- Owen, R. W., Haubner, R., Hull, W. E., Erben, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., & Haber, B. (2003). Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food and Chemical Toxicology*.
- Owen, R. W., Haubner, R., Hull, W. E., Erben, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., & Haber, B. (2003). Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food and Chemical Toxicology, 41*(12), 1727-1738.
- Pacheco, A. R. P. (2015). Análise nutricional, físico-química e atividade antioxidante de frutos de *Quercus sp.* visando a sua valorização. *Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto*.
- Palma, R. D. J. B. (2020). *Alimentos funcionais e nutrigenómica no tratamento e prevenção de doenças*. Universidade Nova de Lisboa.
- Papaefstathiou, E., Agapiou, A., Giannopoulos, S., & Kokkinofita, R. (2018). Nutritional characterization of carobs and traditional carob products. *Food science & nutrition*
- Pasqualone, A., Makhoulouf, F. Z., Barkat, M., Difonzo, G., Summo, C., Squeo, G., & Caponio, F. (2019). Effect of acorn flour on the physico-chemical and sensory properties of biscuits.
- Pereira, A. F. C. (2014). Potenciais alimentos funcionais com base em extratos de vinho de uva ou de videira. *Universidade Fernando Pessoa*.
- Pessoa, A. R. F. (2013). *Valorização biotecnológica da polpa de alfarroba*. Instituto Superior de Ciências da Caúde Egas Moniz.
- Pintado, M. E., & Teixeira, J. A. (2015). Valorização de subprodutos da indústria alimentar: obtenção de ingredientes de valor acrescentado. *Boletim de Biotecnologia, 6*, pp. 10-12.
- Pinto, D., Franco, S. D., Silva, A. M., Cupara, S., Koskovic, M., Kojicic, K., Doares, S., Rodrigues, F., Sut, S., Dall'Acqua, S., & Oliveira, M. B. P. (2019). Chemical characterization and bioactive properties of a coffee-like beverage prepared from *Quercus cerris* kernels. *Food & function*.
- Qasem, M. A., Noordin, M. I., Arya, A., Alsalahi, A., & Jayash, S. N. (2018). Evaluation of the glycemic effect of *Ceratonia siliqua* pods (Carob) on a streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rat model. *PeerJ, 6*, e4788.
- Rakić, S., Petrović, S., Kukić, J., Jadranin, M., Tešević, V., Povrenović, D., & Šiler-Marinković, S. (2007). Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. *Food Chemistry, 104*(2), 830-834.

Ramalhosa, M. J., Paíga, P., Morais, S., Alves, M. R., Delerue-Matos, C., & Oliveira, M. B. P. P. (2012). Lipid content of frozen fish: Comparison of different extraction methods and variability during freezing storage. *Food Chemistry*, *131*(1), 328-336.

Rao, N. Z., & Fuller, M. (2018). Acidity and antioxidant activity of cold brew coffee. *Scientific Reports*, *8*(1), 1-9.

Regulamento (UE) N. o 1169/2011 do parlamento europeu e do conselho. *Jornal Oficial da União Europeia* (2011).

Ribeiro, M. I., Fernandes, A., Cabo, P., & Matos, A. (2017). Qualidade nutricional e tecnológica dos alimentos na ótica do consumidor. *Revista de Ciências Agrárias*, *40*(spe), 255-265.

Rocha, E., & Nogueira, P. (2015). As doenças cardiovasculares em Portugal e na região Mediterrânica: uma perspetiva epidemiológica. *Revista Factores de Risco*.

Rosa, C. S., Tessele, K., Prestes, R. C., Silveira, M., & Franco, F. (2015). Effect of substituting of cocoa powder for carob flour in cakes made with soy and banana flours. *International Food Research Journal*.

Şahin, H., Topuz, A., Pischetsrieder, M., & Özdemir, F. (2009). Effect of roasting process on phenolic, antioxidant and browning properties of carob powder. *European Food Research and Technology*, *230*(1), 155-161.

Santos, A., Gregório, M. J., Sousa, S. M., Anjo, C., Martins, S., Bica, M., & Graça, P. (2018). A importância do potássio e da alimentação na regulação da pressão arterial.

Sardão, R., Amaral, R. A., Alexandre, E. M., Saraiva, J. A., & Pintado, M. (2021). Effect of high-pressure processing to improve the safety and quality of an Quercus acorn beverage

Schieber, A., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments. *Trends in Food Science & Technology*.

Sekeroglu, N., Ozkutlu, F., & Kilic, E. (2017). Mineral composition of acorn coffees. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*.

Shibao, J., & Bastos, D. H. M. (2011). Produtos da reação de *Maillard* em alimentos: implicações para a saúde. *Revista de Nutrição*, *24*, 895-904.

Si, H. S., Kyoung, H. K., Byong, T. J., Sun, H. C., Jae, H. P., Dong, H. K., ... & Sang, H. M. (2012). Antibacterial and antioxidant activities of tannins extracted from agricultural by-products. *Journal of Medicinal Plants Research*, *6*(15), 3072-3079.

Silva, S., Costa, E. M., Borges, A., Carvalho, A. P., Monteiro, M. J., & Pintado, M. M. E. (2016). Nutritional characterization of acorn flour (a traditional component of the Mediterranean gastronomic folklore). *Journal of Food Measurement and Characterization*.

Soares, C., Correia, M., Delerue-Matos, C., & Barroso, M. F. (2017). Investigating the antioxidant capacity of fruits and fruit byproducts through an introductory food chemistry experiment for high school. *Journal of Chemical Education*, *94*(9), 1291-1295.

Soares, C., Machado, J. T., Lopes, A. M., Vieira, E., & Delerue-Matos, C. (2020). Electrochemical impedance spectroscopy characterization of beverages. *Food chemistry*, *302*, 125345.

- Soares, C., Paíga, P., Marques, M., Neto, T., Carvalho, A. P., Paiva, A., ... & Grosso, C. (2021). Multi-Step subcritical water extracts of *Fucus vesiculosus* L. and *Codium tomentosum* stackhouse: Composition, health-benefits and safety. *Processes*, 9(5), 893.
- Soest, P. V. (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of the Association of official Agricultural Chemists*, 46(5), 829-835.
- Sousa, M., Moreira, A., Mota, S., Neves, F., Duarte, M., & Condeço, J. (2010). Avaliação do risco cardiovascular global numa população da zona Norte do País.
- SPBT. (2015). Biotecnologia Alimentar. Boletim - Sociedade Portuguesa de Biotecnologia.
- Srouf, N., Daroub, H., Toufeili, I., & Olabi, A. (2016). Developing a carob-based milk beverage using different varieties of carob pods and two roasting treatments and assessing their effect on quality characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9), 3047-3057.
- Sruthi, N. U., Premjit, Y., Pandiselvam, R., Kothakota, A., & Ramesh, S. V. (2021). An overview of conventional and emerging techniques of roasting: Effect on food bioactive signatures. *Food Chemistry*, 348, 129088.
- Szablowska, E., & Tańska, M. (2021). Acorn flour properties depending on the production method and laboratory baking test results: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 980-1008.
- Taib, M., Bouyazza, L., & Lyoussi, B. (2020). Acorn oil: chemistry and functionality. *Journal of Food Quality*, 2020.
- Teixeira, A. L. (2011). Quantificação da cafeína e seleção precoce para produção em *Coffea arabica* L.
- Tiago, P. (2019). Distribuição Geográfica: Carvalho-alvarinho, Carvalho-cerquinho, Carvalho-negral, Azinheira, Sobreiro. Disponível em <https://brigadadafloresta.abae.pt/> (Acedido a 09/05/2022)
- Ulster University. (2021). CVD Statistics. Disponível em <https://www.ulster.ac.uk/cardiovascular/cvd-prevalence> (Acedido a 30/11/2021)
- USDA. 2002. eds, Gerbhardt SE, Thomas RG. Nutritive value of foods. Home and garden bulletin no. 72. Beltsville, MD: US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory.
- UTAD. (2022). *Ceratonía siliqua* L. Distribuição em Portugal. Disponível em https://jb.utad.pt/especie/Ceratonia_siliqua (Acedido a 27/01/2022)
- Valente, E. P. (2014). *O uso de antioxidantes na prevenção da doença* (Doctoral dissertation, [sn]).
- Van Boekel, M. A. J. S. (2006). Formation of flavour compounds in the *Maillard* reaction. *Biotechnology advances*, 24(2), 230-233.
- Van Boekel, M., Fogliano, V., Pellegrini, N., Stanton, C., Scholz, G., Lalljie, S., Somoza, V., Knorr, D., Rao Jasti, P., & Eisenbrand, G. (2010). A review on the beneficial aspects of food processing. *Molecular nutrition & food research*, 54(9), 1215-1247.
- Vinha, A. F., Barreira, J. C. M., Costa, A. S., & Oliveira, M. B. P. P. (2016a). Uma nova era para *Quercus* spp.: sustentabilidade de recursos naturais subvalorizados.

- Vinha, A. F., Barreira, J. C., Costa, A. S., & Oliveira, M. B. P. (2016b). A new age for *Quercus* spp. fruits: review on nutritional and phytochemical composition and related biological activities of acorns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.
- Vinha, A. F., Costa, A. S. G., Barreira, J. C., Pacheco, R., & Oliveira, M. B. P. (2016c). Chemical and antioxidant profiles of acorn tissues from *Quercus* spp.: Potential as new industrial raw materials.
- Vinholes, J., Grosso, C., Andrade, P. B., Gil-Izquierdo, A., Valentão, P., de Pinho, P. G., & Ferreres, F. (2011). In vitro studies to assess the antidiabetic, anti-cholinesterase and antioxidant potential of *Spergularia rubra*. *Food Chemistry*, *129*(2), 454-462.
- WHO & FAO. (2006). *Food safety risk analysis. A guide for national food safety authorities*.
- WHO. (2021). Cardiovascular diseases (CVDs). Disponível em [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (Acedido a 27/11/2021)
- Wilkins, E., Wilson, L., Wickramasinghe, K., Bhatnagar, P., Leal, J., Luengo-Fernandez, R., Burns, R., Rayner, M., Townsend, N. (2017). *European Cardiovascular Disease Statistics 2017*. European Heart Network, Brussels.
- World Health Organization. (2012). *Guideline: Sodium intake for adults and children*. World Health Organization.
- Xiao, F., Xu, T., Lu, B., & Liu, R. (2020). Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*, *1*(1), 60-69.
- Zunft, H. J. F., Lüder, W., Harde, A., Haber, B., Graubaum, H. J., & Gruenwald, J. (2001). Carob pulp preparation for treatment of hypercholesterolemia. *Advances in therapy*.

6. Anexos

A – Determinação das proteínas solúveis totais (Bradford)

A.1 – Curva de calibração de BSA

Para a determinação das proteínas solúveis pelo método de Bradford foi necessário preparar soluções padrão de BSA de concentrações entre 0 e 0,5 mg/ mL a partir de uma solução mãe de 0,5 mg/ mL em cloreto de sódio (NaCl).

Na Tabela A.1 encontram-se os valores e as respetivas médias das absorvâncias medidas a 595 nm das soluções padrão de BSA e na Figura A.1 a respetiva curva de calibração.

Tabela A 1. Valores da concentração e das absorvâncias medidas a 595nm das soluções padrão de BSA.

Concentração BSA (mg/mL)	Absorvância
0	0,526
0,025	0,580
0,05	0,627
0,1	0,731
0,2	0,861
0,3	0,989
0,4	1,11
0,5	1,29

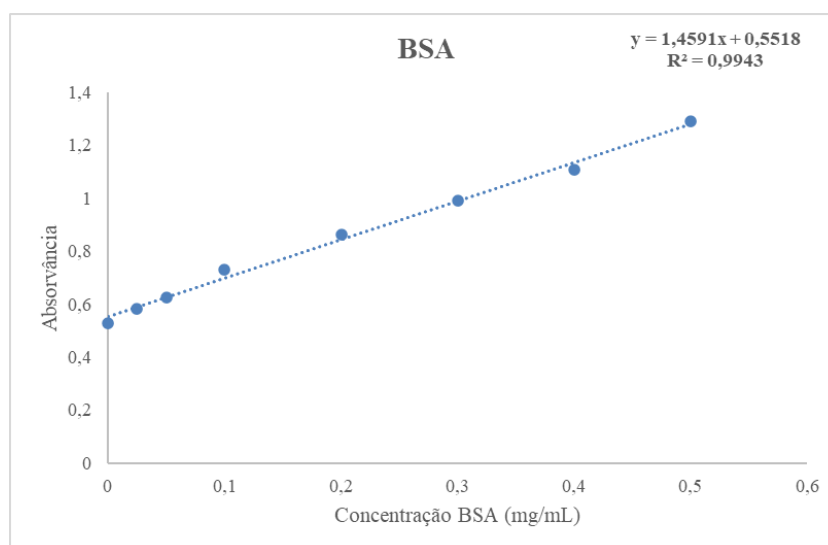


Figura A 1. Curva de calibração da absorvância em função da concentração das soluções padrão de BSA.

B – Determinação dos açúcares totais

B.1 – Curva de calibração de glicose

A partir de uma solução de glicose em etanol 80% (1 mg/ mL), foram preparados vários padrões com diferentes concentrações para obtenção da curva de calibração, ajustada por regressão linear. Os valores e as respetivas médias das absorvâncias medidas a 490 nm das soluções padrão encontram-se representados na Tabela B.1 e a respetiva curva de calibração na Figura B.1.

Tabela B 1. Valores da concentração e das absorvâncias medidas a 490nm das soluções padrão de glicose.

Concentração Glicose (mg/L)	Absorvância
100	0,192
200	0,298
300	0,504
400	0,939
500	1,05
600	1,11
700	1,46
800	1,56
1000	2,17

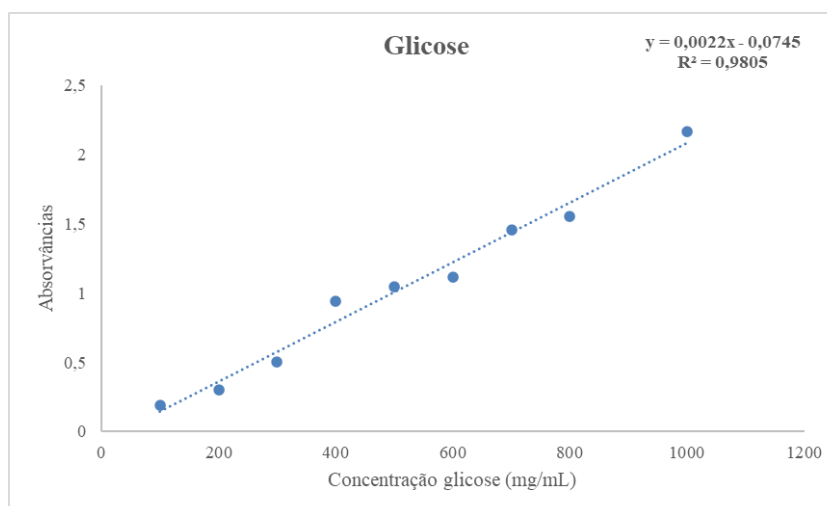


Figura B 1. Curva de calibração da absorvância em função da concentração das soluções padrão de glicose.

C – Determinação do teor de minerais

C.1 – Curvas de calibração para a determinação dos minerais (Ca, K, Mg e Na)

As soluções padrão dos minerais (Ca, K, Mg e Na) foram lidas por absorção atómica com atomização por chama a comprimentos de onda do espectrómetro: 422,7 nm para Ca, 766,5 nm para K, 285,2 nm para Mg e 589,6 nm para Na.

Na Figura C.1 estão representadas as respetivas curvas de calibração de cada solução padrão utilizadas para a determinação do conteúdo mineral nas amostras analisadas.

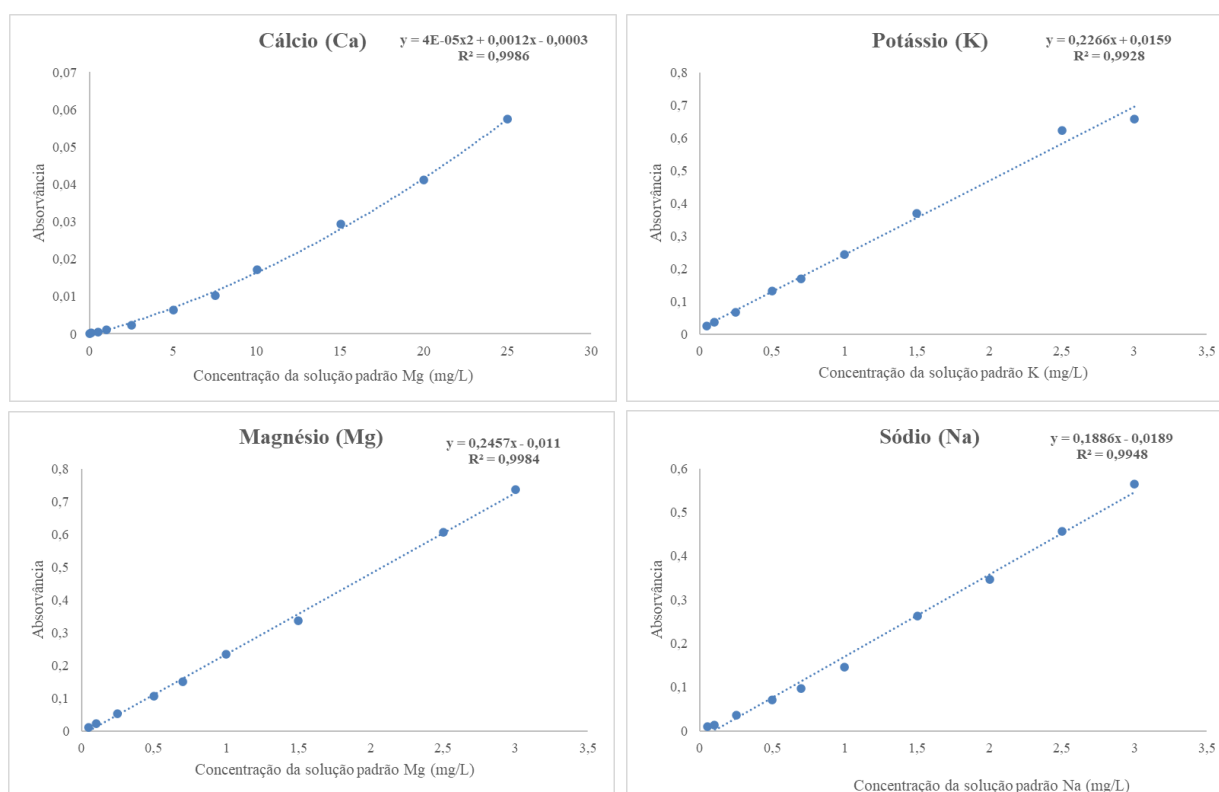


Figura C 1. Curvas de calibração da absorvância em função da concentração das soluções padrão: A) Cálcio (Ca); B) Potássio (K); C) Magnésio (Mg); e D) Sódio (Na).

D – Determinação do teor de taninos condensáveis

D.1 – Curva de calibração de catequina

Na determinação do teor de taninos condensáveis presentes nas amostras, preparou-se soluções padrão de catequina, utilizando um intervalo de concentrações de 0 a 100 mg/L, a partir de uma solução mãe de 100 mg/L efetuando-se diluições usando como solvente água ultrapura.

Na Tabela D.1 encontram-se os valores e as respetivas médias das absorvâncias medidas a 500 nm das soluções padrão de catequina e na Figura D.1 a respetiva curva de calibração.

Tabela D 1. Valores da concentração e das absorvâncias medidas a 500nm das soluções padrão de catequina.

Concentração catequina (mg/L)	Absorvância
0	0,0343
0,5	0,0530
1	0,0537
2	0,0613
5	0,0913
10	0,138
25	0,289
50	0,475
100	0,808

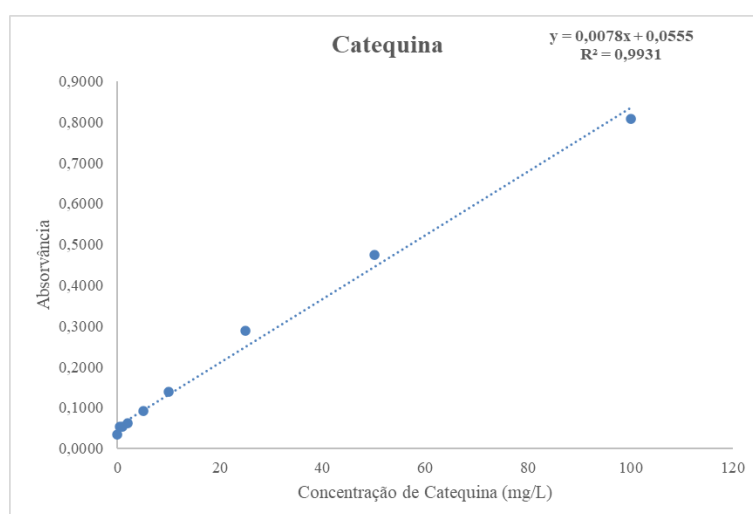


Figura D 1. Curva de calibração da absorvância em função da concentração das soluções padrão de catequina.

E – Determinação do teor compostos fenólicos

E.1 – Curva de calibração de ácido gálgico para a determinação do teor de fenólicos totais (TPC)

Para a determinação dos compostos fenólicos totais foi preparada uma curva de calibração de ácido gálgico como padrão com uma concentração de 200 mg/L, usando um intervalo de concentrações de 0 a 200 mg/L. As concentrações e as respetivas médias das absorvâncias medidas a 765 nm dos padrões encontram-se representados na Tabela E.1 e a respetiva curva de calibração na Figura E.1.

Tabela E 1. Valores da concentração e das absorvâncias medidas a 765 nm das soluções padrão de ácido gálgico.

Concentração ácido gálgico (mg/L)	Absorvância
0	0,0425
10	0,0623
25	0,154
50	0,333
100	0,687
150	1,01

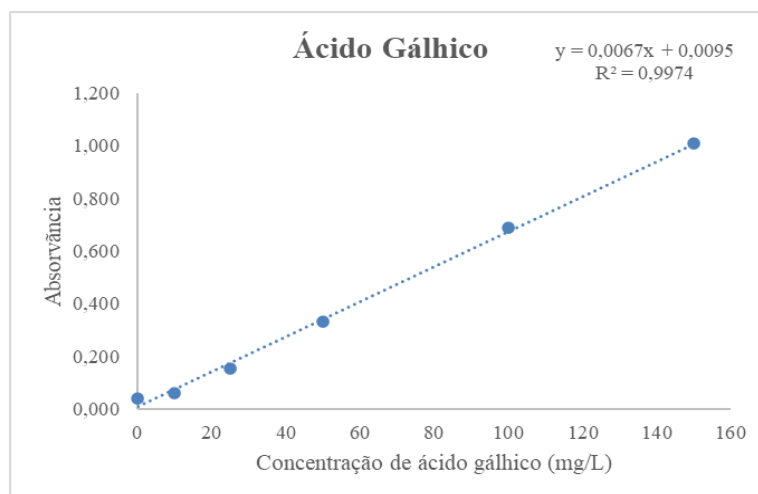


Figura E 1. Curva de calibração da absorvância em função da concentração das soluções padrão de ácido gálgico.

E.2 – Curva de calibração de epicatequina para a determinação flavonoides totais (TFC)

Na quantificação do teor de flavonoides totais preparou-se uma curva de calibração num intervalo de concentrações de 0 a 300 mg/L a partir de uma solução padrão de epicatequina em água ultrapura com uma concentração de 300 mg/L. As concentrações e as respetivas médias das absorvâncias medidas a 510 nm dos padrões encontram-se representados na seguinte Tabela E.2 e a respetiva curva de calibração na Figura E.2.

Tabela E 2. Valores da concentração e das absorvâncias medidas a 510 nm das soluções padrão de epicatequina.

Concentração Epicatequina (mg/L)	Absorvância
0	0,0380
15	0,0749
30	0,111
60	0,178
120	0,327
240	0,631
300	0,743

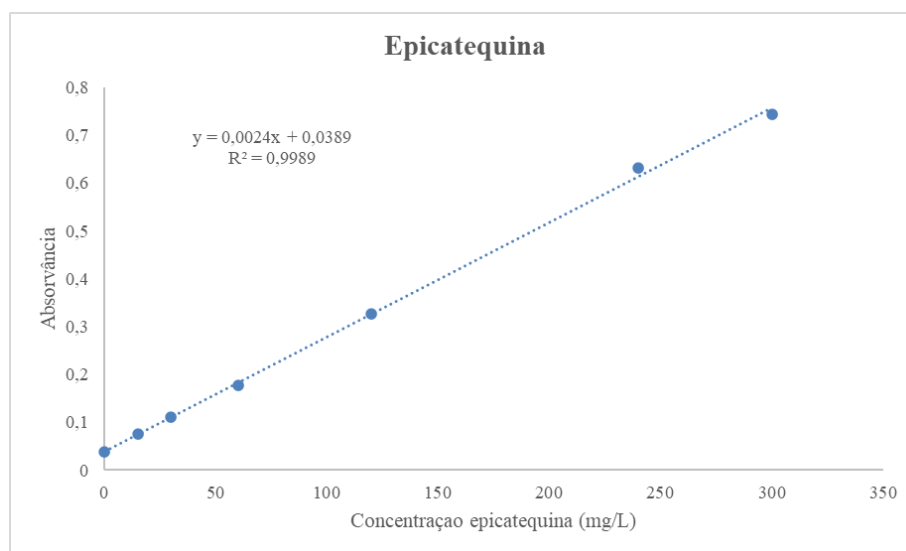


Figura E 2. Curva de calibração da absorvância em função da concentração das soluções padrão de epicatequina.

F – Determinação da capacidade antioxidante pelo método de sequestro de DPPH[•] e ABTS^{•+}

F.1 – Curva de calibração do Trolox para o método de sequestro de DPPH[•]

A curva de calibração foi preparada com soluções de Trolox numa gama de linearidade entre 10 e 100 mg/ mL com água ultrapura, através de uma solução padrão de 100 mg/L.

Na Tabela F.1 encontram-se as concentrações e a respetiva percentagem de inibição do Trolox derivadas da medição das absorvâncias a 517 nm e na Figura F.1 a respetiva curva de calibração.

Tabela F 1. Valores da concentração e das respetivas percentagens de inibição das soluções padrão de Trolox para DPPH.

Concentração Trolox (mg/mL)	% Inibição
0,010	24,3
0,030	33,1
0,050	47,7
0,080	63,8
0,10	82,5
0,13	90,1

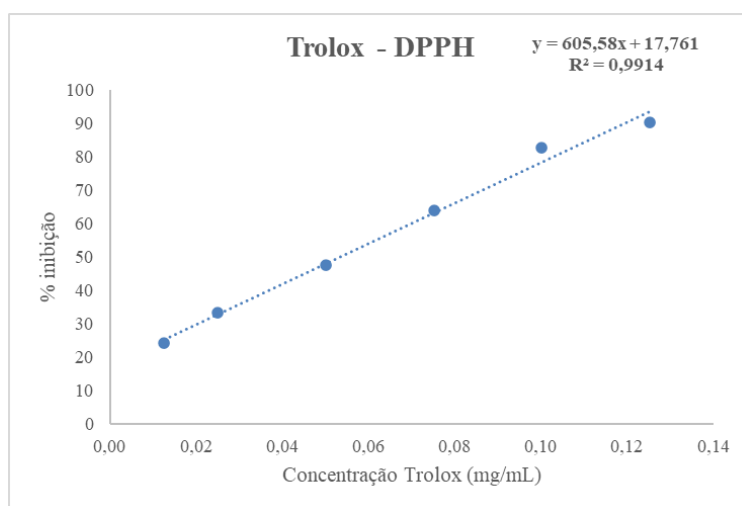


Tabela F 2. Curva de calibração da percentagem de inibição em função da concentração das soluções padrão de Trolox para DPPH.

F.2 – Curva de calibração do trolox para o método de sequestro de ABTS^{•+}

Na determinação da capacidade antioxidante pelo método ABTS foi efetuada uma curva de calibração preparada com soluções de trolox numa gama de linearidade entre 0,005 e 0,1 mg/ mL com água ultrapura, através de uma solução padrão de 100 mg/ L.

Na Tabela F.2 encontram-se as concentrações e a respetiva percentagem de inibição do Trolox derivadas da medição das absorvâncias a 734 nm e na Figura F.2 a respetiva curva de calibração.

Tabela F 3. Valores da concentração e das respetivas percentagens de inibição das soluções padrão de Trolox para ABTS.

Concentração Trolox (mg/mL)	% Inibição
0,00500	15,5
0,0125	21,9
0,0250	30,5
0,0500	51,9
0,0750	73,0
0,100	93,0

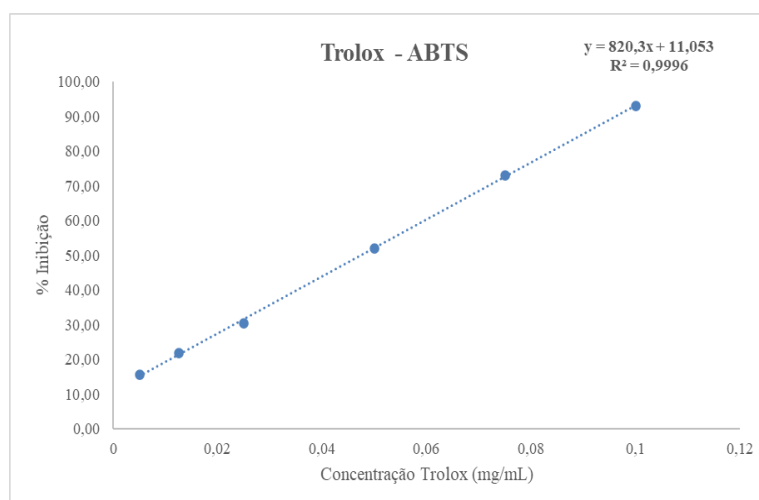


Figura F 1. Curva de calibração da percentagem de inibição em função da concentração das soluções padrão de Trolox para ABTS.

G – Estudo da bioatividade

G.1 – Atividade da α -Glucosidase

Na seguinte Figura G.1 estão representadas as curvas de dose-resposta obtidas da percentagem de inibição de diferentes concentrações dos extratos das amostras em estudo sobre a enzima α -glucosidase.

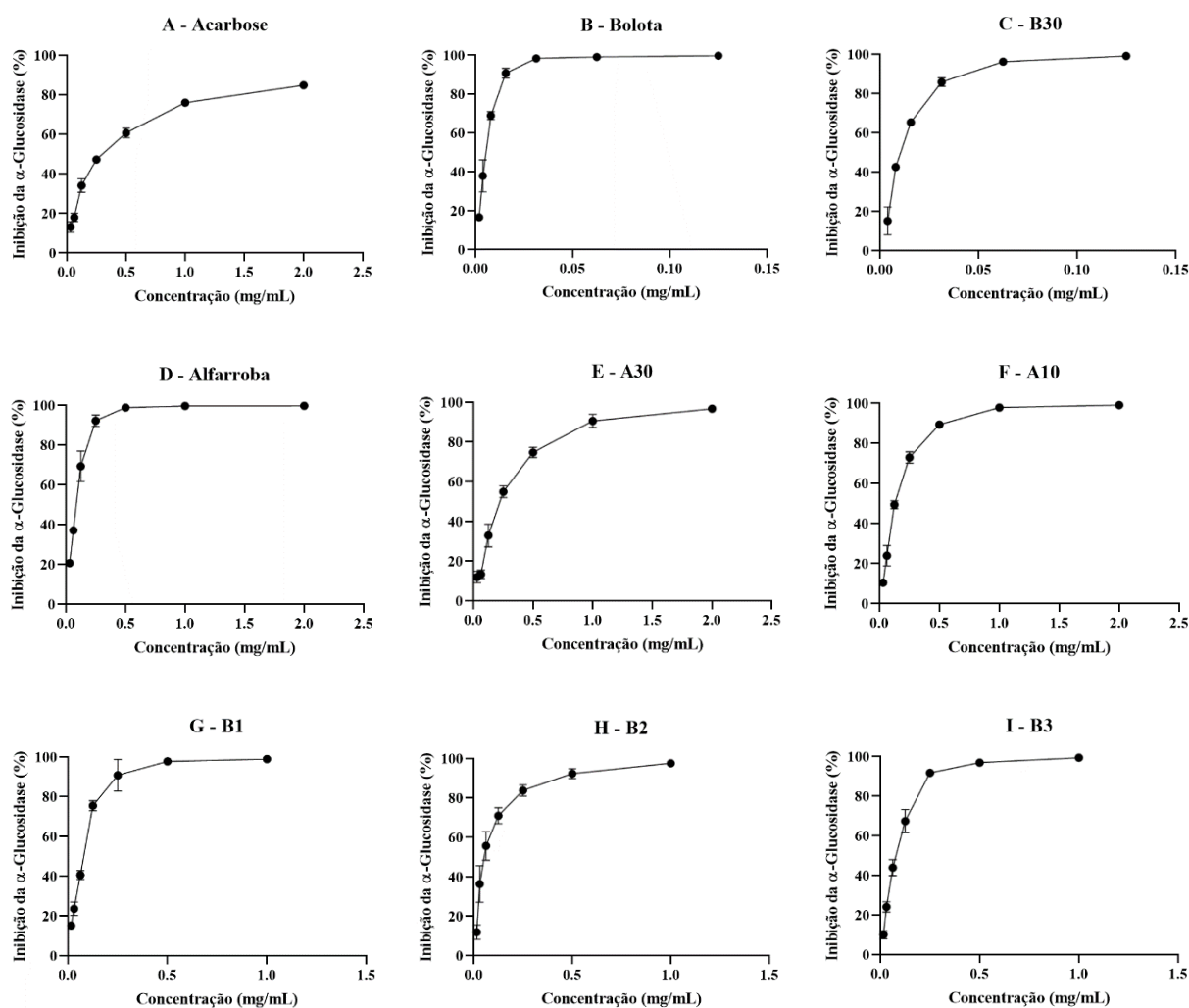


Figura G.1. Gráficos independentes da inibição da α -glucosidase pela acarbose e extratos estudados: A) Acarbose (controlo positivo); B) Bolota; C) B30; D) Alfarroba; E) A30; F) A10; G) B1; H) B2 e I) B3. Os resultados mostram a média \pm SEM de três experiências, realizadas em triplicado, para as amostras dos gráficos A, D, E e F e média \pm SD de pelo menos três experiências independentes para as restantes amostras, dos gráficos B, C, G, H e I.

G.2 – Atividade da α -Amilase

As curvas de dose-resposta obtidas da percentagem de inibição de diferentes concentrações dos extratos das amostras em estudo sobre a enzima α -amilase encontram-se apresentadas na Figura G.2.

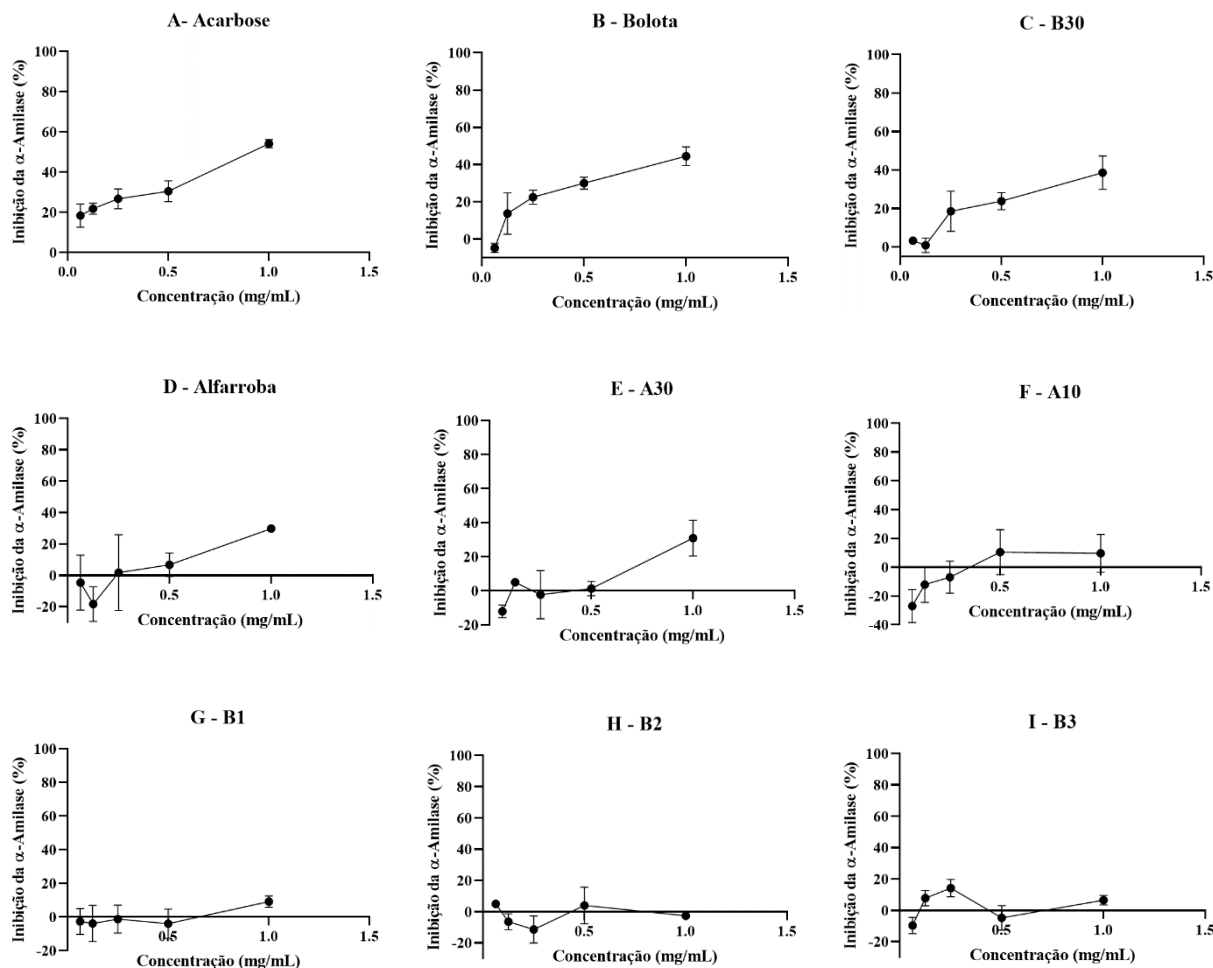


Figura G.2. Gráficos independentes da inibição da α -amilase pela acarbose e extratos estudados: A) Acarbose (controlo positivo); B) Bolota; C) B30; D) Alfarroba; E) A30; F) A10; G) B1; H) B2 e I) B3. Os resultados mostram a média \pm SEM de três experiências, realizadas em triplicado.

H – Resultados da Correlação de Pearson

Figura H 1. Resultados da correlação de Pearson para as amostras sólidas: bolota, B30, alfarroba, A30 e A10.

Cálcio	Magnésio	Sódio	Potássio	Açúcares totais	Proteínas solúveis	Cinzas	Humidade e Teor de sólidos totais	Correlação de Pearson																			
									Humidade e Teor de sólidos totais	Cinzas	Proteínas solúveis	Açúcares totais	Potássio	Sódio	Magnésio	Cálcio	Rácio Na/K	Rácio Ca/Mg	Sal	pH	Inibição da α -amilase	Inibição da α -glucosidase	Lípidos	Fibras inso.	Proteínas totais	índice de browning	280
0,460	0,500	0,217	-0,0371	0,710	-0,0463	0,411	1																				
0,980	0,964	0,870	0,794	0,697	-0,660	1	0,411																				
-0,620	-0,655	-0,443	-0,538	-0,592	1	-0,660	-0,0463																				
0,705	0,750	0,434	0,292	1	-0,592	0,697	0,710																				
0,743	0,662	0,730	1	0,292	-0,538	0,794	-0,0371																				
0,892	0,859	1	0,730	0,434	-0,443	0,870	0,217																				
0,986	1	0,859	0,662	0,750	-0,655	0,964	0,500																				
1	0,986	0,892	0,743	0,705	-0,620	0,980	0,460																				
0,856	0,870	0,939	0,486	0,529	-0,457	0,824	0,328																				
0,970	0,926	0,858	0,776	0,681	-0,548	0,966	0,469																				
0,811	0,774	1,00	0,610	0,440	-0,405	0,743	0,218																				
0,429	0,490	0,201	-0,0118	0,923	-0,344	0,407	0,741																				
-0,577	-0,587	-0,680	-0,474	-0,427	0,299	-0,480	-0,158																				
0,893	0,840	0,886	0,821	0,363	-0,491	0,883	0,235																				
-0,963	-0,976	-0,776	-0,781	-0,836	0,575	-0,959	-0,584																				
0,845	0,836	0,784	0,841	0,416	-0,505	0,872	0,334																				
-0,918	-0,941	-0,731	-0,714	-0,904	0,583	-0,925	-0,597																				
-0,977	-0,994	-0,991	-0,732	-0,904	0,022	-0,975	-0,992																				
-0,794	-0,829	-0,889	-0,398	-0,999	-0,0213	-0,778	-0,820																				
-0,754	-0,791	-0,865	-0,344	-0,993	-0,0337	-0,737	-0,781																				
-0,983	-0,998	-0,994	-0,758	-0,884	0,0493	-0,982	-0,996																				
-0,986	-0,999	-0,995	-0,778	-0,864	0,050	-0,986	-0,999																				
0,767	0,731	0,709	0,914	0,279	-0,124	0,775	0,745																				
0,748	0,739	0,806	0,834	0,183	-0,606	0,755	-0,238																				
-0,576	-0,594	-0,376	-0,246	-0,848	0,111	-0,559	-0,944																				
0,187	0,154	0,290	0,340	-0,344	0,0202	0,187	-0,505																				
-0,391	-0,432	-0,295	-0,0683	-0,858	0,151	-0,386	-0,746																				
-0,870	-0,875	-0,671	-0,610	-0,884	0,328	-0,856	-0,768																				

Índice de browning	Proteínas totais	Fibras insolúveis	Lípidos	Inibição da α -glucosidase	Inibição da α -amilase	pH	Sal	Rácio Ca/Mg	Rácio Na/K
-0,992	-0,597	0,334	-0,584	0,235	-0,158	0,741	0,218	0,469	0,328
-0,975	-0,925	0,872	-0,959	0,883	-0,480	0,407	0,743	0,966	0,824
0,0225	0,583	-0,505	0,575	-0,491	0,299	-0,344	-0,405	-0,548	-0,457
-0,904	-0,904	0,416	-0,836	0,363	-0,427	0,923	0,440	0,681	0,529
-0,732	-0,714	0,841	-0,781	0,821	-0,474	-0,0118	0,610	0,776	0,486
-0,991	-0,731	0,784	-0,776	0,886	-0,680	0,201	1,00	0,858	0,939
-0,994	-0,941	0,836	-0,976	0,840	-0,587	0,490	0,774	0,926	0,870
-0,977	-0,918	0,845	-0,963	0,893	-0,577	0,429	0,811	0,970	0,856
-0,954	-0,704	0,689	-0,730	0,767	-0,628	0,341	0,939	0,787	1
-0,942	-0,893	0,831	-0,941	0,890	-0,505	0,411	0,783	1	0,787
-0,768	-0,670	0,462	-0,676	0,779	-0,699	0,245	1	0,783	0,939
-0,639	-0,725	0,087	-0,602	0,022	-0,330	1	0,245	0,411	0,341
0,508	0,534	-0,213	0,508	-0,457	1	-0,330	-0,699	-0,505	-0,628
-0,838	-0,703	0,917	-0,815	1	-0,457	0,0222	0,779	0,890	0,767
0,992	0,977	-0,806	1	-0,815	0,508	-0,602	-0,676	-0,941	-0,730
-0,755	-0,689	1	-0,806	0,917	-0,213	0,0870	0,462	0,831	0,689
0,981	1	-0,689	0,977	-0,703	0,534	-0,725	-0,670	-0,893	-0,704
1	0,981	-0,755	0,992	-0,838	0,508	-0,639	-0,768	-0,942	-0,954
0,882	0,936	-0,368	0,829	-0,519	0,632	-0,925	-0,835	-0,745	-0,916
0,850	0,913	-0,308	0,791	-0,465	0,640	-0,948	-0,828	-0,704	-0,901
0,999	0,976	-0,784	0,997	-0,860	0,481	-0,604	-0,756	-0,950	-0,950
0,996	0,966	-0,809	0,998	-0,878	0,466	-0,570	-0,741	-0,955	-0,946
-0,660	-0,541	0,963	-0,733	0,927	-0,039	-0,151	0,294	0,783	0,543
-0,820	-0,512	0,753	-0,605	0,835	-0,254	-0,172	0,582	0,657	0,715
0,977	0,776	-0,366	0,723	-0,320	0,448	-0,873	-0,384	-0,632	-0,394
-0,0747	0,0979	0,246	0,0336	0,334	-0,224	-0,509	0,174	0,138	0,217
0,651	0,689	-0,0335	0,555	-0,0359	0,512	-0,977	-0,355	-0,414	-0,354
0,991	0,949	-0,652	0,936	-0,663	0,590	-0,757	-0,623	-0,892	-0,643

Correlação de Pearson	DPPH	ABTS	TFC	TPC	Taninos condens.	AGEs	420	360	294	280
Humidade e Teor de sólidos totais	-0,768	-0,746	-0,505	-0,944	-0,238	0,745	-0,999	-0,996	-0,781	-0,820
Cinzas	-0,856	-0,386	0,187	-0,559	0,755	0,775	-0,986	-0,982	-0,737	-0,778
Proteínas solúveis	0,328	0,151	0,020	0,111	-0,606	-0,124	0,0496	0,0493	-0,0337	-0,0213
Açúcares totais	-0,884	-0,858	-0,344	-0,848	0,183	0,279	-0,864	-0,884	-0,993	-0,999
Potássio	-0,610	-0,068	0,340	-0,246	0,834	0,914	-0,778	-0,758	-0,344	-0,398
Sódio	-0,671	-0,295	0,290	-0,376	0,806	0,709	-0,995	-0,994	-0,865	-0,889
Magnésio	-0,875	-0,432	0,154	-0,594	0,739	0,731	-0,999	-0,998	-0,791	-0,829
Cálcio	-0,870	-0,391	0,187	-0,576	0,748	0,767	-0,986	-0,983	-0,754	-0,794
Rácio Na/K	-0,643	-0,354	0,217	-0,394	0,715	0,543	-0,946	-0,950	-0,901	-0,916
Rácio Ca/Mg	-0,892	-0,414	0,138	-0,632	0,657	0,783	-0,955	-0,950	-0,704	-0,745
Sal	-0,623	-0,355	0,174	-0,384	0,582	0,294	-0,741	-0,756	-0,828	-0,835
pH	-0,757	-0,977	-0,509	-0,873	-0,172	-0,151	-0,570	-0,604	-0,948	-0,925
Inibição da α -amilase	0,590	0,512	-0,224	0,448	-0,254	-0,039	0,466	0,481	0,640	0,632
Inibição da α -glucosidase	-0,663	-0,0359	0,334	-0,320	0,835	0,927	-0,878	-0,860	-0,465	-0,519
Lípidos	0,936	0,555	0,0336	0,723	-0,605	-0,733	0,998	0,997	0,791	0,829
Fibras inso.	-0,652	-0,0335	0,246	-0,366	0,753	0,963	-0,809	-0,784	-0,308	-0,368
Proteínas totais	0,949	0,689	0,098	0,776	-0,512	-0,541	0,966	0,976	0,913	0,936
índice de browning	0,991	0,651	-0,0747	0,977	-0,820	-0,660	0,996	0,999	0,850	0,882
280	0,907	0,931	0,101	0,962	-0,454	-0,232	0,838	0,860	0,998	1
294	0,880	0,953	0,117	0,942	-0,395	-0,169	0,801	0,826	1	0,998
360	0,985	0,617	-0,0688	0,967	-0,844	-0,693	0,999	1	0,826	0,860
420	0,980	0,583	-0,086	0,955	-0,866	-0,723	1	0,999	0,801	0,838
AGEs	-0,601	0,136	0,267	-0,489	0,969	1	-0,723	-0,693	-0,169	-0,232
Taninos condens.	-0,344	0,226	0,578	0,0983	1	0,969	-0,866	-0,844	-0,395	-0,454
TPC	0,893	0,889	0,464	1	0,0983	-0,489	0,955	0,967	0,942	0,962
TFC	0,121	0,483	1	0,464	0,578	0,267	-0,0862	-0,0688	0,117	0,101
ABTS	0,749	1	0,483	0,889	0,226	0,136	0,583	0,617	0,953	0,931
DPPH	1	0,749	0,121	0,893	-0,344	-0,601	0,980	0,985	0,880	0,907

Figura H 2. Resultados da correlação de Pearson para as bebidas: B1, B2, B3, CF e CEV.

Rácio Na/K	Cálcio	Magnésio	Sódio	Potássio	Açúcares totais	Proteínas solúveis	Cinzas	Humidade e Teor de sólidos totais	Correlação de Pearson Humidade e Teor de sólidos
-0,506	0,532	-0,322	-0,675	-0,591	0,347	0,758	-0,604	1	
0,0369	-0,0674	0,902	0,679	0,952	-0,182	-0,164	1	-0,604	Cinzas
-0,804	0,202	0,0341	-0,647	-0,221	-0,118	1	-0,164	0,758	Proteínas solúveis
0,489	0,803	0,0136	0,358	-0,0749	1	-0,118	-0,182	0,347	Açúcares totais
0,0740	-0,0340	0,852	0,749	1	-0,0749	-0,221	0,952	-0,591	Potássio
0,702	0,153	0,565	1	0,749	0,358	-0,647	0,679	-0,675	Sódio
-0,0695	0,282	1	0,565	0,852	0,014	0,034	0,902	-0,322	Magnésio
0,126	1	0,282	0,153	-0,0340	0,803	0,202	-0,0674	0,532	Cálcio
1	0,126	-0,0695	0,702	0,0740	0,489	-0,804	0,0369	-0,506	Rácio Na/K
-0,208	0,0481	-0,835	-0,789	-0,941	0,0143	0,278	-0,960	0,630	Rácio Ca/Mg
0,702	0,153	0,565	1,00	0,749	0,358	-0,647	0,679	-0,675	Sal
-0,0636	-0,162	0,883	0,578	0,920	-0,330	-0,108	0,984	-0,612	pH
0,282	0,271	-0,159	0,154	-0,128	0,614	0,156	-0,182	0,274	Inibição da α -amilase
-0,911	0,159	0,412	-0,118	0,659	0,410	0,789	0,646	0,673	Inibição da α -glucosidase
-0,430	-0,172	0,519	-0,142	0,326	-0,652	0,0912	0,448	-0,271	Lípidos
-0,228	0,511	-0,172	-0,356	-0,374	0,612	0,588	-0,404	0,798	Fibras inso.
-0,710	-0,0664	-0,408	-0,984	-0,655	-0,440	0,751	-0,563	0,638	Índice de browning
-0,341	-0,697	0,045	-0,255	0,106	-0,968	-0,101	0,218	-0,445	280
-0,399	-0,623	0,207	-0,206	0,224	-0,949	-0,060	0,347	-0,448	294
-0,604	-0,455	-0,138	-0,679	-0,259	-0,863	0,330	-0,131	0,0412	360
-0,524	-0,139	-0,616	-0,961	-0,793	-0,400	0,605	-0,727	0,588	420
-0,822	-0,194	0,104	-0,725	-0,151	-0,717	0,619	-0,00382	0,271	AGEs
0,407	0,565	-0,0310	0,386	0,0155	0,915	-0,0179	-0,105	0,296	Taninos condens.
0,245	-0,455	0,589	0,697	0,810	-0,424	-0,687	0,839	-0,938	TPC
-0,385	-0,447	0,616	0,115	0,625	-0,769	-0,0955	0,741	-0,547	TFC
0,552	-0,284	0,484	0,941	0,803	0,000270	-0,822	0,749	-0,892	ABTS
0,838	-0,0441	0,217	0,931	0,491	0,364	-0,908	0,385	-0,724	DPPH

(Continua)

360	294	280	Índice de brownin g	Fibras insolúveis	Lípidos	Imbição da α-glucosida	Imbição da α-amilase	pH	Sal	Rácio Ca/Mg
0.0412	-0.448	-0.445	0.638	0.798	-0.271	0.673	0.274	-0.612	-0.675	0.630
-0.131	0.347	0.218	-0.563	-0.404	0.448	0.646	-0.182	0.984	0.679	-0.960
0.330	-0.0605	-0.101	0.751	0.588	0.0912	0.789	0.156	-0.108	-0.647	0.278
-0.863	-0.949	-0.968	-0.440	0.612	-0.652	0.410	0.614	-0.330	0.358	0.0143
-0.259	0.224	0.106	-0.655	-0.374	0.326	0.659	-0.128	0.920	0.749	-0.941
-0.679	-0.206	-0.255	-0.984	-0.356	-0.142	-0.118	0.154	0.578	1	-0.789
-0.138	0.207	0.0451	-0.408	-0.172	0.519	0.412	-0.159	0.883	0.565	-0.835
-0.455	-0.623	-0.697	-0.0664	0.511	-0.172	0.159	0.271	-0.162	0.153	0.0481
-0.604	-0.399	-0.341	-0.710	-0.228	-0.430	-0.911	0.282	-0.0636	0.702	-0.208
0.373	-0.117	0.00331	0.732	0.283	-0.214	-0.783	0.0384	-0.913	-0.789	1
-0.679	-0.206	-0.255	-0.984	-0.356	-0.142	-0.118	0.154	0.578	1	-0.789
0.0300	0.485	0.356	-0.436	-0.482	0.571	0.669	-0.300	1	0.578	-0.913
-0.636	-0.893	-0.844	-0.0886	0.827	-0.818	0.807	1	-0.300	0.154	0.0384
-0.808	-0.801	-0.779	-0.577	0.807	-0.364	1	0.807	0.669	-0.118	-0.783
0.697	0.832	0.753	0.293	-0.554	1	-0.364	-0.818	0.571	-0.142	-0.214
-0.373	-0.702	-0.710	0.206	1	-0.554	0.807	0.827	-0.482	-0.356	0.283
0.785	0.352	0.392	1	0.206	0.293	-0.577	-0.089	-0.436	-0.984	0.732
0.873	0.985	1	0.392	-0.710	0.753	-0.779	-0.844	0.356	-0.255	0.00331
0.850	1	0.985	0.352	-0.702	0.832	-0.801	-0.893	0.485	-0.206	-0.117
1	0.850	0.873	0.785	-0.373	0.697	-0.808	-0.636	0.0300	-0.679	0.373
0.740	0.284	0.365	0.963	0.171	0.155	-0.792	-0.00538	-0.613	-0.961	0.864
0.910	0.731	0.696	0.819	-0.133	0.724	0.588	-0.552	0.151	-0.725	0.244
-0.935	-0.962	-0.973	-0.522	0.626	-0.809	0.793	0.815	-0.256	0.386	-0.129
0.0306	0.550	0.492	-0.585	-0.768	0.471	-0.787	-0.698	0.845	0.697	-0.785
0.562	0.878	0.793	0.0300	-0.648	0.839	-0.876	-0.890	0.839	0.115	-0.546
-0.440	0.0891	0.0467	-0.896	-0.538	0.0314	-0.555	-0.304	0.677	0.941	-0.831
-0.665	-0.266	-0.264	-0.937	-0.344	-0.254	-0.708	0.0331	0.271	0.931	-0.542

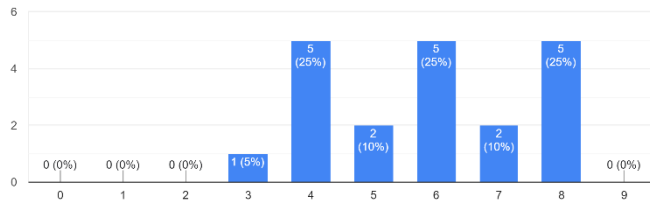
Correlação de Pearson de Pearson	Humidade e Teor de sólidos	Cinzas	Proteínas solúveis	Açúcares totais	Potássio	Sódio	Magnésio	Cálcio	Rácio Na/K	Rácio Ca/Mg	Sal	pH	Inibição da α -amilase	Inibição da α -glucosidase	Lípidos	Fibras inso.	Índice de browning	280	294	360	420	AGEs	Taninos condens.	TPC	TFC	ABTS	DPPH	Correlação de Pearson
	-0,724	0,385	-0,908	0,364	0,491	0,931	0,217	-0,0441	0,838	-0,542	0,931	0,271	0,0331	-0,708	-0,254	-0,344	-0,937	-0,264	-0,266	-0,665	-0,828	-0,826	0,372	0,583	-0,0815	0,863	1	
	-0,892	0,749	-0,822	0,000270	0,803	0,941	0,484	-0,284	0,552	-0,831	0,941	0,677	-0,304	-0,555	0,0314	-0,538	-0,896	0,0467	0,0891	-0,440	-0,884	-0,539	0,116	0,873	0,369	1		
	-0,938	0,839	-0,687	-0,424	0,810	0,697	0,589	-0,455	0,245	-0,785	0,697	0,845	-0,698	-0,787	0,471	-0,768	-0,585	0,492	0,550	0,0306	-0,629	-0,785	0,581	0,755	0,369	1		
	0,296	-0,105	-0,0179	0,915	0,0155	0,386	-0,0310	0,565	0,407	-0,129	0,386	-0,256	0,815	0,793	-0,809	0,626	-0,522	-0,973	-0,962	-0,935	-0,489	-0,785	0,581	0,731	0,116	0,372		
	0,271	-0,004	0,619	-0,717	-0,151	-0,725	0,104	-0,194	-0,822	0,244	-0,725	0,151	-0,552	0,588	0,724	-0,133	0,819	0,696	0,731	0,910	0,677	1	0,677	0,284	-0,539	-0,884		
	0,588	-0,727	0,605	-0,400	-0,793	-0,961	-0,616	-0,139	-0,524	0,864	-0,961	-0,613	-0,00538	-0,792	0,155	0,171	0,963	0,365	0,284	0,740	1	0,677	0,284	0,284	-0,884	-0,828		

I – Análise Sensorial

Nas Figuras I1, I2 e I3 estão representados os dados relativos à análise sensorial das bebidas B1, B2 e B3, respetivamente.

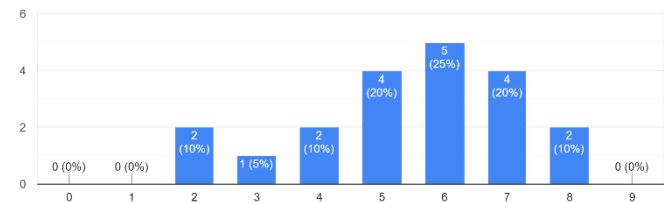
Aparência: Nota
20 respostas

A



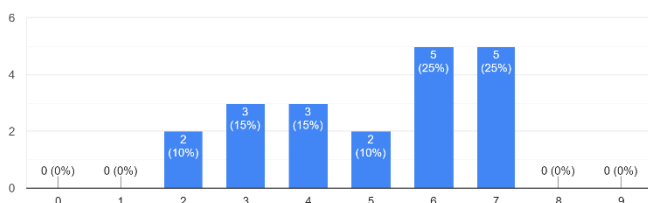
Aroma: Nota
20 respostas

B



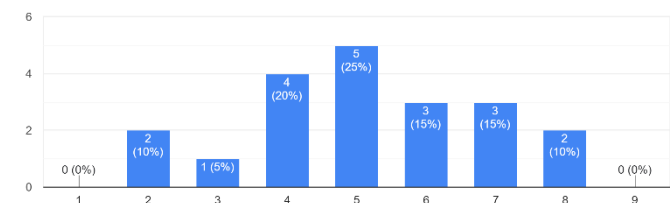
Sabor: Nota
20 respostas

C



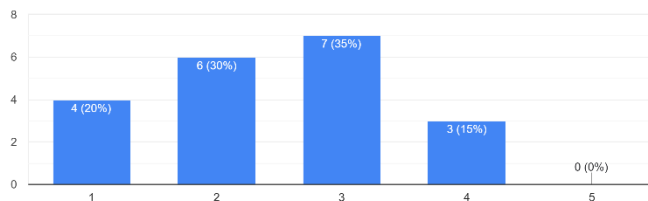
Nota de aceitação global
20 respostas

D



Nota da intenção de compra
20 respostas

E



F

Acha que esta bebida precisaria ser adoçada?
20 respostas

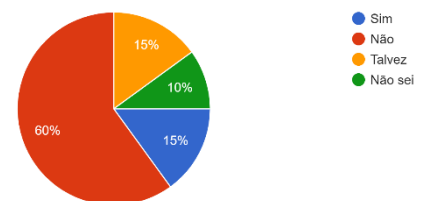
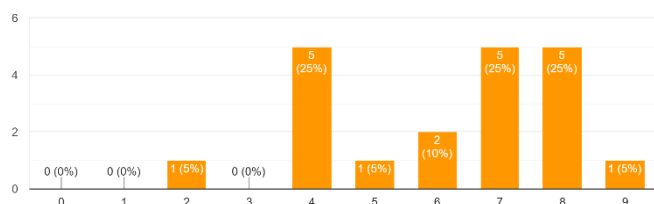


Figura I 1. Análise sensorial da B1: A – aparência; B – aroma; C – sabor; D – aceitação global; E – intenção de compra; e F – necessidade de adoçar a bebida.

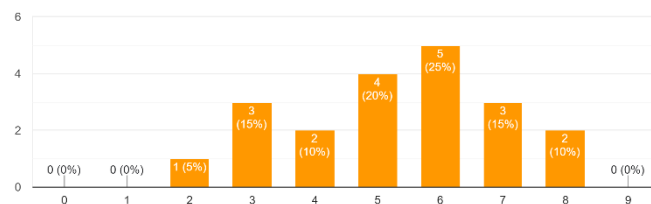
Aparência: Nota
20 respostas

A



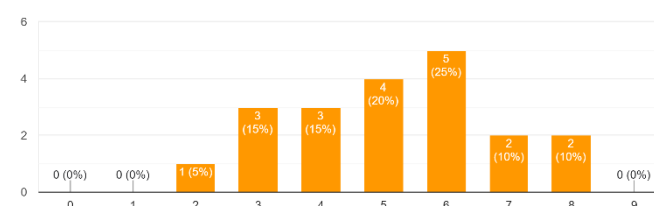
Aroma: Nota
20 respostas

B



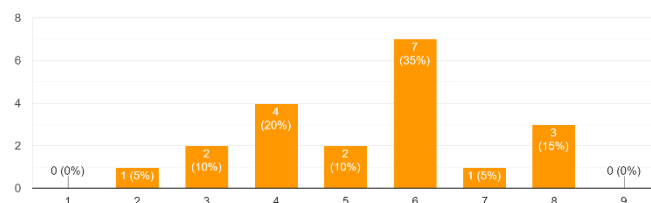
Sabor: Nota
20 respostas

C



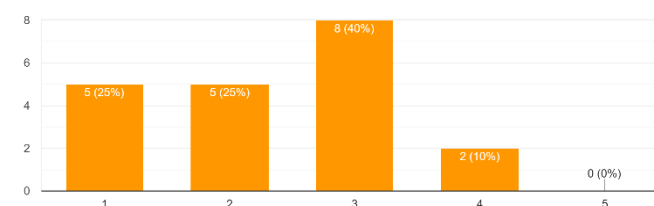
Nota de aceitação global
20 respostas

D



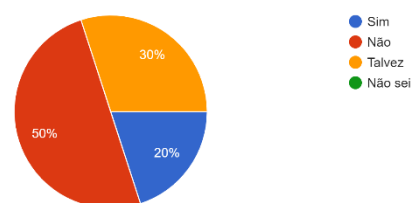
Nota da intenção de compra
20 respostas

E



Acha que esta bebida precisaria ser adoçada?
20 respostas

F

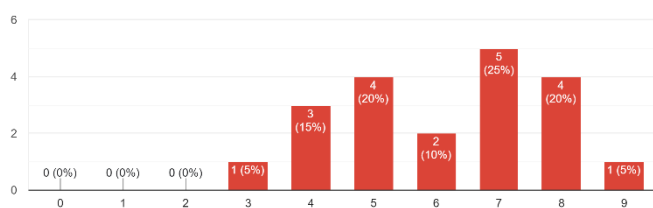


~

Figura I 2. Análise sensorial da B2: A – aparência; B – aroma; C – sabor; D – aceitação global; E – intenção de compra; e F – necessidade de adoçar a bebida.

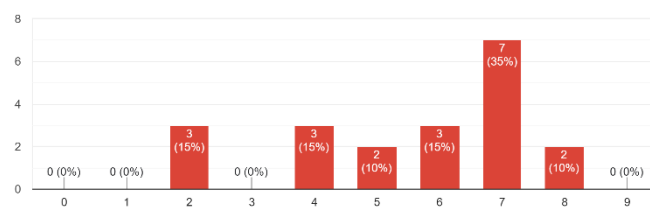
Aparência: Nota
20 respostas

A



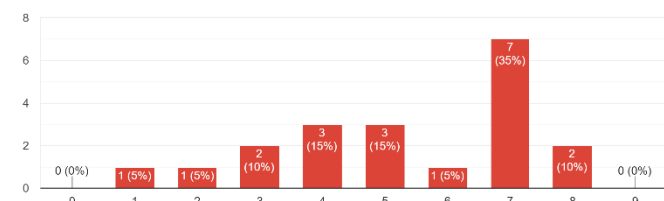
Aroma: Nota
20 respostas

B



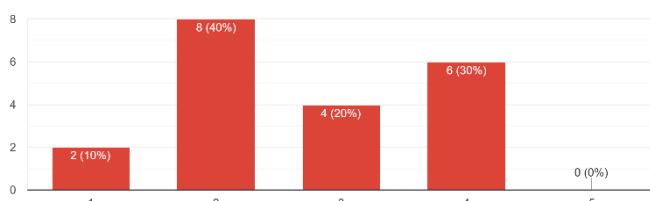
Sabor: Nota
20 respostas

C



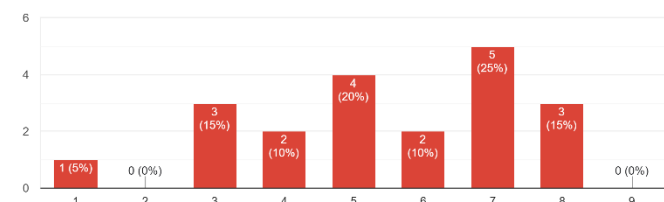
Nota da intenção de compra
20 respostas

D



Nota de aceitação global
20 respostas

E



Acha que esta bebida precisaria ser adoçada?
20 respostas

F

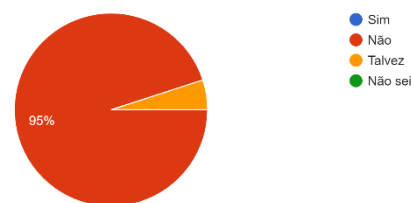
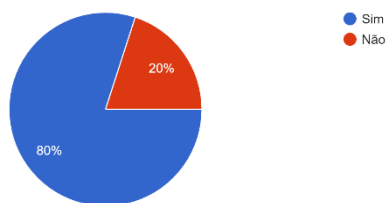


Figura I 3. Análise sensorial da B3: A – aparência; B – aroma; C – sabor; D – aceitação global; E – intenção de compra; e F – necessidade de adoçar a bebida.

Nas Figuras I4 e I5 encontram-se representados os resultados de questões adicionais que foram realizadas aos participantes sobre o seu consumo em café e/ou em bebidas substitutas de café e dados relativos ao sexo e faixa etária, respetivamente.

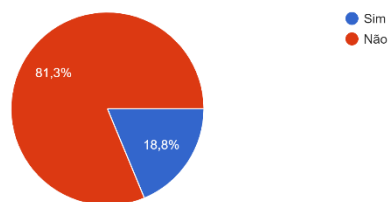
É consumidor de café?

20 respostas



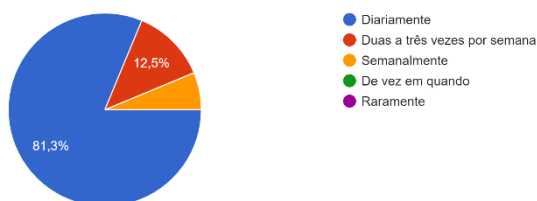
Costuma adoçar o seu café?

16 respostas



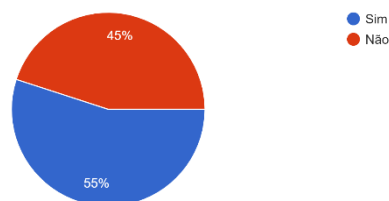
Com que frequência consome café?

16 respostas



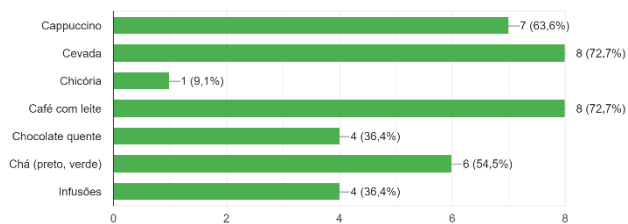
Costuma consumir bebidas alternativas ao café?

20 respostas



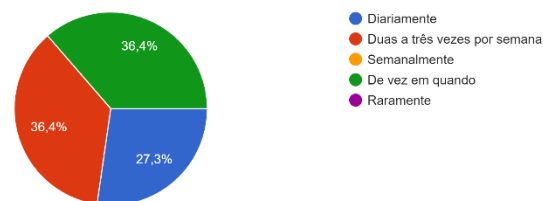
Que bebidas alternativas ao café costuma consumir?

11 respostas



Com que frequência consome essas bebidas?

11 respostas



Compraria uma bebida funcional substituta de café?

20 respostas

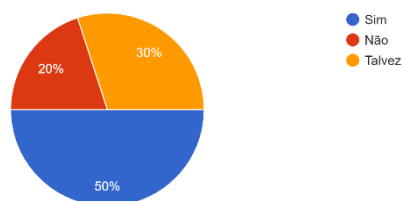
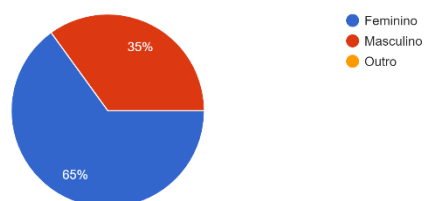


Figura I 4. Questões adicionais da análise sensorial.

Sexo

20 respostas



Faixa etária

20 respostas

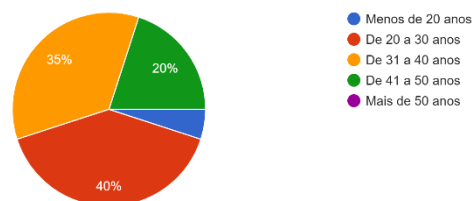


Figura I 5. Dados relativos ao sexo e faixa etária dos participantes.

Na Tabela II encontra-se representado o teste de Cronbach realizado para as três bebidas.

Tabela I 1. Teste de Cronbach para as três bebidas: B1, B2 e B3.

Bebidas funcionais	Estatísticas de Fiabilidade		
	Alfa de Cronbach	Alfa de Cronbach baseado em itens padronizados	Número de itens
B1	0,927	0,936	5
B2	0,899	0,910	5
B3	0,931	0,943	5