



CATÓLICA

ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

INGREDIENTES DERIVADOS DO PROCESSAMENTO DA AMÊNDOA:
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA FORMULAÇÃO DE ALIMENTOS
FUNCIONAIS

por

Márcia Patrícia Oliveira Maia Barbosa

Novembro 2018



CATOLICA

ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

INGREDIENTES DERIVADOS DO PROCESSAMENTO DA AMÊNDOA:
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA FORMULAÇÃO DE ALIMENTOS
FUNCIONAIS

INGREDIENTS DERIVED FROM ALMOND PROCESSING: CHARACTERIZATION
AND APPLICATION IN THE FORMULATION OF FUNCTIONAL FOODS

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Aplicada

por

Márcia Patrícia Oliveira Maia Barbosa

Local: CBQF/Escola Superior de Biotecnologia

Orientação: Prof. Doutora Ana Gomes e Prof. Doutora Ana Cristina Freitas

Co-orientação: Doutora Dina Rodrigues

Novembro 2018

Resumo

O consumo de produtos alimentares de origem vegetal em substituição de produtos lácteos tem vindo a aumentar, quer por razões médicas devido à intolerância à lactose e as alergias às proteínas do leite, quer pela adoção de estilos de vida em que dietas alternativas ou vegetarianas/vegans são praticadas por questões relacionadas com a saúde e sustentabilidade. Neste contexto, este trabalho dividiu-se em duas partes: i) caracterização microbiológica, química e biológica de bebida de amêndoa e de dois coprodutos derivados do processamento da amêndoa, nomeadamente o resíduo resultante do fabrico da bebida de amêndoa e o soro resultante da produção de “queijo” de amêndoa tipo fresco; e ii) formulação, produção e caracterização (microbiológica, química e biológica) de bebidas fermentadas à base de soro e de bebida de amêndoa por *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 e *Streptococcus thermophilus* e de cremes para barrar à base de resíduo de amêndoa com e sem incorporação de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12.

A caracterização microbiológica da bebida e dos coprodutos revelou alguma heterogeneidade nos números de células viáveis dos diferentes grupos microbiológicos analisados. Em termos de composição foi o resíduo de amêndoa que apresentou maior teor de açúcares totais, proteína total e de ácidos gordos totais. A atividade inibidora da α -glucosidase oscilou entre 10-30 % para a bebida e os coprodutos derivados da amêndoa. A hidrólise do resíduo de amêndoa com Viscozyme L permitiu um incremento da capacidade de captura do radical ABTS^{•+} de 21 vezes relativamente à do resíduo *per si*, sendo igualmente 5 vezes superior à da bebida e do soro de amêndoa. Todas as matrizes de amêndoa evidenciaram atividade prebiótica, porém o soro, o resíduo na concentração de 4 % (m/v) e o resíduo hidrolisado na concentração de 2 % (m/v), revelaram ser as melhores fontes de carbono alternativas para o crescimento de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12. A fermentação das bebidas (soro e bebida de amêndoa 1:1) com *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 e *S. thermophilus* decorreu durante 3,5 e 4,5 h, até se atingir um pH final de 4,5. A fermentação potenciou (9-17 vezes) o aumento da concentração de proteína total, não afetando a capacidade de captura do radical ABTS^{•+} face às matérias-primas de origem. O creme para barrar pasteurizado (CP) para além de ser composto pelos ácidos gordos presentes na amêndoa, também apresentou teores significativos de ácido láurico e mirístico. Os cremes CP e o creme pasteurizado com probiótico (CPP) foram bem aceites pelos provadores, no que diz respeito à intenção de compra e à intensidade dos atributos organoléticos.

Palavras-chave: coprodutos de amêndoa, propriedades biológicas, bebida prebiótica, creme para barrar, análise sensorial; qualidade nutricional e microbiológica.

Abstract

The consumption of plant food products as a substitute for dairy products has been increasing, both for medical reasons due to lactose intolerance and allergies to milk proteins, or due to the adoption of lifestyles where alternative or vegetarian/vegan diets are practiced due to concerns about health and sustainability issues. In this context, this work was divided in two parts: i) microbiological, chemical and biological characterization of almond milk and two co-products derived from the processing of the almond, namely the residue resulting from the manufacture of the almond milk and the serum resulting from the production of fresh-type almond cheese-like product; ii) formulation, production and characterization (microbiological, chemical and biological) of fermented beverages based on serum and almond milk with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Streptococcus thermophilus* and almond residue spread creams with and without incorporation of *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12.

The microbiological characterization of the almond milk and the co-products revealed some heterogeneity among the viable cell numbers of the different microbial groups analyzed. In terms of characterization, it was the almond residue that presented the highest total sugars, total protein and total fatty acids content. The α -glucosidase inhibitory activity ranged from 10-30 % for the almond milk and almond-derived co-products. The hydrolysis of the almond residue with viscozyme L enabled a 21-fold increase in the ability to capture the ABTS^{•+} radical against the residue *per se* and was 5 times higher than that of the almond milk and the serum. All the almond matrices showed prebiotic activity, but the serum, the residue at the concentration of 4 % (w/v) and the hydrolyzed residue at the concentration of 2 % (w/v), proved to be the best alternative carbon sources for the growth of *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12. The fermentation of the beverages (serum and almond milk 1:1) with *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *S. thermophilus* occurred during 3.5 and 4.5 h until a final pH of 4.5 was reached. The fermentation potentiated an increase (9-17 times) in the total protein concentration, without affecting the capturing capacity of the ABTS^{•+} radical compared to the raw materials. The pasteurized spread cream (CP), besides the characteristic fatty acids present in almonds, also had a high concentration of lauric and myristic acids. The CP cream and the pasteurized probiotic cream (CPP) were well accepted by the tasters in terms of purchase intent and intensity of organoleptic attributes.

Keywords: almond processing co-products, biological properties, probiotic almond milk, spread cream, nutritional and microbiological quality, sensory analysis.

Agradecimentos

A realização deste trabalho contribuiu em grande medida para o meu enriquecimento quer a nível pessoal, quer a nível profissional e por este motivo não poderia deixar de agradecer a todos os que de alguma forma possibilitaram a concretização de mais uma etapa tão importante para minha vida.

Por isso começo por agradecer às minhas orientadoras, Doutora Ana Maria Gomes e Doutora Ana Cristina Freitas por terem confiado em mim para a realização deste trabalho de investigação e por todo o apoio prestado ao longo da realização do mesmo. Também agradeço à minha co-orientadora Dina Rodrigues por toda a ajuda prestada e todo o conhecimento transmitido, e obviamente a todos os colaboradores do CBQF, que também me apoiaram e acolheram durante esta minha passagem pelo laboratório.

À empresa Yogan pela colaboração e apoio neste projeto de investigação, o meu muito obrigada.

A todos os meus amigos e ao meu namorado, obrigada por estarem sempre comigo nos momentos mais difíceis. E por último, um especial agradecimento a toda a minha família pelo apoio incondicional. Sem todos eles nada disto seria possível.

A todos os meus sinceros agradecimentos.

Índice

Resumo	v
Abstract.....	vii
Agradecimentos	ix
Lista de Figuras	xv
Lista de Tabelas.....	xix
Lista de Abreviaturas.....	xxi
1. Introdução	1
1.1. Substitutos do leite de origem vegetal (SLOVs)	1
1.2. Substitutos de queijo de origem vegetal (SQOVs).....	3
1.3. Alimentos tradicionais fermentados à base de plantas	6
1.4. Leis, interesse governamental e mundial sobre substitutos lácteos.....	9
1.5. Impacto no clima e no uso da terra.....	10
1.6. Amêndoa.....	11
1.6.1. Amêndoa: Propriedades nutricionais e alimentos funcionais	13
1.6.1.1. Propriedades antioxidantes	15
1.6.1.2. Redução do colesterol e do risco de doenças cardiovasculares.....	15
1.6.1.3. Propriedades anti-inflamatórias, supressão da fome e redução da obesidade	16
1.6.1.4. Propriedades prebióticas.....	18
1.7. Aproveitamento de subprodutos da amêndoa	19
1.8. Aproveitamento dos coprodutos resultantes da produção da bebida de amêndoa e análogos de queijo	20
1.9. Objetivos e layout da tese	21
2. Materiais e métodos	24
2.1. Caracterização dos ingredientes derivados do processamento da amêndoa.....	25
2.1.1. Caracterização microbiológica e pH	25
2.1.2. Peso seco e ensaios de desidratação.....	25
2.1.3. Caracterização química	26

2.1.3.1. Hidrólise do resíduo de amêndoa	26
2.1.3.2. Acidez titulável	26
2.1.3.3. Quantificação de açúcares totais	27
2.1.3.4. Quantificação de proteínas totais	27
2.1.3.5. Quantificação de ácidos gordos esterificados e não esterificados.....	28
2.1.4. Caracterização biológica.....	29
2.1.4.1. Atividade antioxidante	29
2.1.4.1.1. ABTS ⁺⁺	29
2.1.4.1.2. DPPH.....	30
2.1.4.2. Atividade antidiabética.....	30
2.1.4.3. Atividade prebiótica	31
2.1.4.3.1. Avaliação através da determinação da densidade ótica em microplaca ...	31
2.1.4.3.2. Avaliação através da determinação do número de células viáveis em macroplaca.....	32
2.2. Desenvolvimento e caracterização de novos produtos funcionais	34
2.2.1. Produção de bebidas fermentadas	34
2.2.2. Produção de cremes para barrar	36
2.3. Análise Estatística.....	38
3. Resultados e Discussão	38
3.1. Caracterização microbiológica e pH.....	38
3.2. Peso seco e ensaios de desidratação	41
3.3. Caracterização química.....	43
3.4. Caracterização biológica.....	48
3.4.1. Atividade antioxidante	48
3.4.2. Atividade antidiabética.....	49
3.4.3. Atividade prebiótica	50
3.5. Produção de bebidas fermentadas.....	53
3.5.1. Estabilidade microbiana e pH	54
3.5.2. Caracterização química.....	57
3.5.3. Caracterização biológica	58
3.5.3.1. Atividade antioxidante.....	58

3.5.3.2. Atividade antidiabética	60
3.6. Produção de cremes de amêndoa para barrar	60
3.7. Estabilidade microbiana e pH	61
3.7.3. Caracterização química	62
3.5.3. Caracterização biológica	65
3.5.3.1. Atividade antioxidante.....	65
3.5.3.2. Atividade antidiabética	66
3.5.4. Análise sensorial	67
4. Conclusões gerais	68
5. Trabalho futuro.....	70
6. Anexos	71
6.1. Composição comercial do meio de cultura <i>Streptococcus thermophilus</i> Isolation Agar (STIA).....	71
7. Apêndices.....	72
7.1. Curva de calibração do método Fenol-Ácido-Sulfúrico.....	72
7.2. Curva de calibração do método Proteínas BCA	72
7.3. Curva de calibração do método ABTS*+	72
7.4. Curva de calibração do método DPPH	73
7.5. Questionário de análise sensorial	74
8. Bibliografia	78

Lista de Figuras

Figura 1.1. Classificação dos queijos de imitação ou de substituição. Adaptado de Fox <i>et al.</i> (2017).	4
Figura 1.2. Representação esquemática das principais etapas de fabrico de um queijo de imitação. Adaptado de Masotti <i>et al.</i> (2018).	5
Figura 1.3. Estrutura anatômica da amêndoa. Adaptado de Martínez-Gómez <i>et al.</i> (2008)...	12
Figura 1.4. Representação esquemática da estrutura da tese ne do trabalho experimental desenvolvido.....	23
Figura 2.1. Amostras de bebida de amêndoa(a), resíduo de amêndoa (b) e soro de amêndoa (c).....	24
Figura 2.2. Representação esquemática do procedimento experimental da produção de três diferentes cremes para barrar (CNP, CP e CPP).	36
Figura 2.3. Exemplo de disposição de material para a prova de análise sensorial relativa aos cremes para barrar.	38
Figura 3.1. Teor de acidez titulável (a), açúcares totais (b) e de proteínas totais (c) em amostras de bebida, resíduo e soro de amêndoa e de resíduo de amêndoa hidrolisado com viscozyme L. Valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p < 0,05$).....	44
Figura 3.2. Concentração equivalente de compostos fenólicos (■) e percentagem de inibição (●) relativas à captura do radical do radical ABTS ^{•+} (a) e à captura do radical DPPH (b) nas diferentes amostras de bebida, resíduo e soro de amêndoa e resíduo de amêndoa hidrolisado. Para cada amostra, valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p < 0,05$).	48
Figura 3.3. Percentagem de inibição da α -glucosidase determinada em amostras de bebida, resíduo e soro de amêndoa e de resíduo de amêndoa hidrolisado com viscozyme L. Valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p < 0,05$).	49
Figura 3.4. Curvas de crescimento de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 (DO a 660 nm) em diferentes matrizes e respetivos controlos ao longo de 24 h de incubação a 37 °C: a) bebida de amêndoa (-●-), soro de amêndoa (-■-), e mistura do soro com a bebida (1:1) (-▲-) e respetivos controlos de MRS com glucose (-□-), FOS (-○-) e sem adição de fonte carbono (-△-); b) MRS com resíduo de amêndoa a 2% (-●-) e 4 %(-■-) (m/v) ou com resíduo	

hidrolisado com Viscozyme® L a 2 % (-▲-) (m/v) e respetivos controlos de MRS com glucose (-□-), FOS (-○-) e sem adição de fonte de carbono (-△-)..... 51

Figura 3.5. Evolução do número de células viáveis de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (a; c) e de valores de pH (b; d) em diferentes matrizes e respetivos controlos ao longo de 48 h de incubação a 37 °C: a) número de células viáveis em bebida de amêndoa (-●-), soro de amêndoa (-■-), e na mistura do soro com a bebida de amêndoa (1:1) (-▲-) e nos respetivos controlos de MRS com glucose (-□-), FOS (-○-) e sem adição de fonte carbono (-△-); b) valores de pH nas mesmas amostras definidas em a; c) número de células viáveis em MRS com resíduo de amêndoa a 2% (-●-) e 4 %(-■-) (m/v) ou com resíduo hidrolisado com Viscozyme® L a 2 % (-▲-) (m/v) e respetivos controlos de MRS com glucose (-□-), FOS (-○-) e sem adição de fonte de carbono (-△-); d) valores de pH nas mesmas amostras definidas em c. 52

Figura 3.6. Bebidas fermentadas com *B. animalis* subsp. *lactis* BB12: (a) bebida de soro de amêndoa fermentada (BSF) e (b) bebida de mistura soro e bebida de amêndoa fermentada (1:1) (BMF)..... 54

Figura 3.7. Evolução do número de células viáveis de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (-▲-;-△-) e *S. thermophilus* (-●-;-○-) (a;c) e variação de pH (-■-;-□-) (b;d), na bebida de soro de amêndoa fermentada (BSF) (-▲-;-●-;-■-) e na bebida de mistura fermentada (BMF) (-△-;-○-;-□-) ao longo do tempo de fermentação a 37 °C (a;b) e ao longo do tempo de armazenamento (0-21 dias) sob condições de refrigeração (c;d)..... 55

Figura 3.8. Evolução do número de células viáveis de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (-▲-;-△-) e *S. thermophilus* (-●-;-○-) (a;c) e variação de pH (-■-;-□-) (b;d), na bebida de soro de amêndoa fermentada (BSF) (-▲-;-●-;-■-) e na bebida de mistura fermentada (BMF) (-△-;-○-;-□-) ao longo do tempo de fermentação a 37 °C (a;b) e ao longo do tempo de armazenamento (0-21 dias) sob condições de refrigeração (c;d)..... 56

Figura 3.9. Teor de acidez titulável (a), açúcares totais (b) e de proteína total (c) em bebida de soro de amêndoa fermentada (BSF) e em bebida de mistura fermentada (BMF) após 0 (■) e 21 (■) dias de armazenamento sob refrigeração decorrentes do ensaio 2. Valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa no que ao tempo de armazenamento diz respeito ($p>0,05$). 57

Figura 3.10. Concentração equivalente de compostos fenólicos (■) e percentagem de inibição (●) relativas à captura do radical do radical ABTS^{•+} (a) e à captura do radical DPPH (b) em bebida de soro de amêndoa fermentada (BSF) e em bebida de mistura fermentada (BMF) após

0 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração decorrentes do ensaio 2. Para cada amostra, valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p < 0,05$).	59
Figura 3.11. Percentagem de inibição da α -glucosidase determinada em bebida de soro de amêndoa fermentada (BSF) e em bebida de mistura fermentada (BMF) após 0 (■) e 21 (■) dias de armazenamento sob refrigeração decorrentes do ensaio 2. Valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p < 0,05$).....	60
Figura 3.12. Cremes de amêndoa para barrar: a) Creme de barrar não pasteurizado (CNP), b) Creme de barrar pasteurizado (CP) e, c) Creme de barrar pasteurizado probiótico com <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 (CPP).....	61
Figura 3.13. Valores de acidez titulável em creme de barrar não pasteurizado (CNP), creme de barrar pasteurizado (CP) e em creme de barrar pasteurizado probiótico (CPP) após 0 (■), 7 (■) e 14 dias de armazenamento (■) sob refrigeração. Valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p < 0,05$).....	62
Figura 3.14. Teor de açúcares totais (a) e de proteínas totais (b) em cremes de barrar não pasteurizado (CNP), pasteurizado (CP) e pasteurizado probiótico (CPP) após a sua produção. Valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p < 0,05$).	63
Figura 3.15 Concentração equivalente de compostos fenólicos (■) e percentagem de inibição (●) relativas à captura do radical do radical ABTS ^{•+} (a) e à captura do radical DPPH (b) em cremes de barrar não pasteurizado (CNP), pasteurizado (CP) e pasteurizado probiótico (CPP) após produção. Para cada amostra, valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p < 0,05$).	66
Figura 3.16. Inibição (%) da α -glucosidase determinada nos cremes de amêndoa de barrar não pasteurizado (CNP), pasteurizado (CP) e pasteurizado probiótico (CPP) (0 dias).	67
Figura 7.1. Curva de calibração obtida usando a glucose como padrão para calcular os valores de açúcar no método Fenol-Ácido-Sulfúrico.....	72
Figura 7.2. Curva de calibração obtida usando o ácido ascórbico como padrão para calcular os valores no método de BCA.....	72
Figura 7.3. Curva de calibração obtida usando o ácido ascórbico como padrão para calcular os valores no método de ABTS ^{•+}	72
Figura 7.4. Curva de calibração obtida usando o ácido ascórbico como padrão para calcular os valores no método de DPPH.....	73

Lista de Tabelas

Tabela 1.1. Perfil nutricional e energético da bebida de amêndoa (Adaptado de Vanga e Raghavan, 2017).....	3
Tabela 1.2. Alimentos e bebidas tradicionais, fermentado/não fermentado, à base de plantas nativas de todo o mundo (Fontes: Bansal <i>et al.</i> , 2016; Prado <i>et al.</i> , 2007; Blandino <i>et al.</i> , 2003; Oi e Kitabatake, 2003).	7
Tabela 1.3. Composição média nutricional da amêndoa com e sem pele (branqueada). ¹	14
Tabela 2.1. Amostras recolhidas entre outubro de 2017 e julho de 2018 de bebida de amêndoa, resíduo de amêndoa e soro de amêndoa.....	24
Tabela 2.2. Meios de cultura seletivos e diferenciais e respectivas condições de incubação para os diferentes grupos de microrganismos analisados.	25
Tabela 2.3. Meios de cultura e respetivos controlos utilizados na avaliação da atividade prebiótica.....	33
Tabela 3.1. Número de células viáveis para os diferentes microrganismos em amostras de bebida de amêndoa, resíduo e soro de amêndoa de diferentes lotes.....	40
Tabela 3.2. Valores de pH em amostras de bebida, resíduo e soro de amêndoa identificadas de diferentes lotes.....	41
Tabela 3.3. Teor de peso seco e de humidade em amostras de resíduo de amêndoa húmido, desidratado e desidratado moído.....	41
Tabela 3.4. Teor de ácidos gordos esterificados e de ácidos gordos livres em amostras de bebida, resíduo e soro de amêndoa. Para cada amostra (bebida, resíduo e soro) valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p > 0,05$); na: não aplicável ...	46
Tabela 3.5. Número de células viáveis de diferentes microrganismos em cremes de barrar não pasteurizado (CNP), pasteurizado (CP) e pasteurizado probiótico (CPP), e respetivos valores de pH ao longo de 14 dias de armazenamento sob refrigeração.	61
Tabela 3.6. Teor de ácidos gordos esterificados e não esterificados em amostras de creme de barrar pasteurizado (CP); na: não aplicável.	64
Tabela 3.7. Aceitação e intenção de compra do consumidor (média±desvio-padrão) e intensidade dos atributos aspeto, odor, sabor, cremosidade, consistência e adstringência dos cremes de barrar pasteurizado (CP) e pasteurizado probiótico (CPP).	67
Tabela 6.1. Composição comercial do meio de cultura <i>Streptococcus thermophilus</i> Isolation Agar (STIA).....	71

Lista de Abreviaturas

AACC	<i>American Association of Cereal Chemists</i>
ABTS ⁺⁺	3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico
ALA	Ácido α -linolénico
ALP	Ácido linoleico conjugado
BAL	Bactérias do ácido láctico
BCA	Ácido bicinconínico
BMF	Bebida de mistura fermentada
BSF	Bebida de soro de amêndoa fermentada
BMNF	Bebida de mistura não fermentada
BSNF	Bebida de soro de amêndoa não fermentada
CNP	Creme de barrar não pasteurizado
CP	Creme de barrar pasteurizado
CPP	Creme de barrar pasteurizado probiótico
DHA	Ácido docosaheptaenóico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
dH ₂ O	Água destilada
FA	Fibra alimentar
EPA	Ácido eicosapentaenóico
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Gramas
GEE	Gases de efeito de estufa
h	Hora
HDL	Lipoproteínas de elevada densidade
IMC	Índice de massa corporal
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
mL	Mililitro
min	Minuto
PNA	Polissacarídeos não amiláceos
rpm	Rotações por minuto

s	Segundo
SLOV	Substituto do leite de origem vegetal
SQOV	Substituto do queijo de origem vegetal
UFC	Unidades formadoras de colónia
UHT	Ultrapasteurização - <i>Ultra high temperature</i>
USDA	United States Department of Agriculture
µL	Microlitro

1. Introdução

Os produtos alimentares de origem vegetal estão a tornar-se cada vez mais populares entre os consumidores e o mercado associado está a expandir-se rapidamente. Este tipo de alimentos tem vindo a ser impulsionado pela urgência em dar resposta às necessidades alimentares da crescente população mundial, sendo que as fontes de alimentos sustentáveis e nutritivos estão a tornar-se uma preocupação cada vez maior, tanto para as empresas como para os consumidores. Esta tendência baseia-se em vários fatores, como a mudança de estilo de vida, o interesse por dietas alternativas e a crescente consciencialização sobre a produção sustentável de alimentos, especialmente no que toca às proteínas (Jeske *et al.*, 2017). Também um número crescente de consumidores tem vindo a optar por substitutos do leite de origem vegetal (SLOVs) por razões fisiológicas que incluem intolerância à lactose, alergia ao leite de vaca, hipercolesterolemia e fenilcetonúria, por adoção de uma dieta vegetariana ou *vegan* ou por preocupações relacionadas com a potencial presença de hormonas de crescimento ou de resíduos de antibióticos no leite de vaca. Além disso, em países onde o leite de mamífero é escasso e caro, os SLOVs resultam numa opção mais acessível (Mäkinen *et al.*, 2016).

Um estudo do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) mostrou uma diminuição progressiva no consumo *per capita* de leite de vaca, ao mesmo tempo que houve uma proliferação de bebidas de origem vegetal a serem comercializadas (Stewart *et al.*, 2013). Sabe-se que as vendas de leite de vaca diminuíram 7 % em 2015, estimando-se que reduzam mais 11 % até 2020 (Zegler J., 2013). Se esta tendência se mantiver, é importante compreender como estas bebidas alternativas se posicionam em relação ao leite de vaca, não apenas no que diz respeito à sua composição nutricional, mas também no que diz respeito à biodisponibilidade de nutrientes (Singhal *et al.*, 2017).

1.1. Substitutos do leite de origem vegetal (SLOVs)

Tecnologicamente, os SLOVs são suspensões de material vegetal dissolvido e desintegrado em água. São fabricados através da extração aquosa de material vegetal que dá origem a um líquido rico em nutrientes e que será a base da bebida de origem vegetal. Os SLOVs podem ter origem em extratos aquosos de leguminosas, sementes, cereais ou pseudocereais e frutos oleaginosos como nozes ou amêndoas que se assemelham em termos de aparência ao leite de vaca (Mäkinen *et al.*, 2016; Sethi *et al.*, 2016). Para tal, tradicionalmente a fonte vegetal é inicialmente moída em suspensão aquosa, sendo depois filtrada para remover as partículas mais grosseiras (Mäkinen *et al.*, 2016). Embora existam inúmeras variações do processo, o esboço geral do processo moderno em escala industrial é essencialmente o mesmo: o material

vegetal é previamente suspenso em água para extração do líquido nutritivo ou alternativamente, a matéria-prima é previamente moída e, é a farinha que é depois humedecida em água. A etapa de extração é muito importante, já que vai afetar em grande medida a composição do produto final (Mäkinen *et al.*, 2016). O resíduo resultante da moagem pode ser separado por filtração ou decantação. Dependendo do tipo de bebida que se pretende obter, a padronização e/ou adição de outros ingredientes, como açúcar, óleo, aromatizantes e estabilizantes, pode ocorrer, seguida de homogeneização e pasteurização ou tratamento por alta temperatura (UHT), para melhorar a suspensão e estabilidade microbiana (Diarra *et al.*, 2005). Possíveis pré-tratamentos das matérias-primas também podem ser aplicados, como o descasque e branqueamento (Debruyne, 2006). Hoje em dia existe uma vasta gama de bebidas alternativas disponíveis no mercado, como por exemplo, as bebidas de aveia, de soja, de amendoim, de arroz, de sésamo, de amêndoa e de coco. A bebida de soja continua a ser o SLOV mais consumido, tendo registado em 2017 39 % das vendas globais de produtos alternativos ao leite. No entanto, a sua participação no mercado encontra-se a diminuir face a outras alternativas existentes no mercado (RaboBank, 2018). No que diz respeito à bebida de amêndoa, está previsto uma taxa de crescimento de 15,45 % do mercado global de bebida de amêndoa entre 2016 e 2020 (Global Almond Milk Market Report 2016-2020).

A bebida de amêndoa possui um alto valor nutricional aliado a uma composição equilibrada em proteínas, gorduras (Jenkins *et al.*, 2002), fibras, vitaminas e minerais (Spiller e Miller, 2003) que tem contribuído para o aumento da sua popularidade. Em comparação com outras bebidas alternativas, a bebida de amêndoa é naturalmente uma boa fonte de vitaminas, especialmente de vitamina E, que não pode ser sintetizada pelo organismo necessitando de ser fornecida através de dieta ou de suplementos (Vanga e Raghavan, 2017). O perfil nutricional de 7 marcas de bebidas de amêndoa encontra-se descrito na Tabela 1.1. As bebidas de amêndoa contempladas no estudo de Vanga e Raghavan, (2017), parecem apresentar grande heterogeneidade entre si, no que diz respeito a grande parte dos parâmetros nutricionais.

Embora a procura por bebidas alternativas esteja a aumentar, o mercado ainda é pequeno e precisa de progredir, já que a falta de vontade do consumidor em experimentar alimentos novos e desconhecidos, que são percebidos como pouco atrativos, pode ser um fator limitante. Apesar dos SLOVs poderem ter uma qualidade sensorial melhorada, ainda carregam este estigma devido aos produtos iniciais menos atrativos que foram lançados no mercado (Wansink *et al.*, 2005). Deste modo, uma maior informação sobre as características

organolépticas e possíveis benefícios para a saúde podem contribuir positivamente para uma melhor aceitação deste tipo de produtos (Mäkinen *et al.*, 2016).

Tabela 1.1. Perfil nutricional e energético da bebida de amêndoa (Adaptado de Vanga e Raghavan, 2017).

Parâmetros nutricionais	Teor ou valor energético (média ± desvio padrão)	N
Hidratos de carbono (g/240 mL)	1,42±0,90	7
Açúcares	0,11±0,28	7
Fibras	0,64±0,45	7
Gorduras (g/240 mL)	2,71±0,48	7
Saturadas	0,00±0,00	7
Ácidos gordos mono-insaturados	1,67±0,29	3
Ácidos gordos poli-insaturados	0,67±0,28	3
Colesterol	0,00±0,00	7
Proteínas (g/240 mL)	1,67±1,63	6
Minerais (mg/240 mL)		
Cálcio	325,29±193,55	7
Ferro	0,18±0,13	7
Magnésio	21,00±9,90	4
Fósforo	48,00±62,35	3
Potássio	65,00±58,84	5
Sódio	146,42±36,25	7
Zinco	0,56±0,46	4
Vitaminas		
Vitamina C (mg/240 mL)	0,00±0,00	7
Riboflavina (mg/240 mL)	0,19±0,15	5
Folato (µg/240 mL)	19,2±0,00	1
Vitamina B-12 (µg/240 mL)	1,00±0,00	4
Vitamina A (µg/240 mL)	77,14±45,35	7
Vitamina E (mg/240 mL)	3,84±2,15	5
Vitamina D (µg/240 mL)	2,32±0,88	7
Energia (kcal/240 mL)	36,43±6,90	7

N: dimensão amostral

1.2. Substitutos de queijo de origem vegetal (SQOVs)

Os substitutos de queijo foram introduzidos nos Estados Unidos no início da década de 1970. Estes produtos são semelhantes ao queijo em aparência, características e até mesmo no uso a que se destinam. De acordo com alguns autores, um substituto de queijo de origem vegetal (SQOV) não deve ser nutricionalmente inferior ao queijo que pretende imitar (Fox *et al.*, 2004; Chavan e Jana, 2007). Podem, então, ser definidos como produtos que pretendem substituir, parcialmente ou totalmente, o queijo tradicional, e em que a gordura e/ou a proteína lácteas são parcialmente ou totalmente substituídas por alternativas de origem vegetal como por exemplo, proteínas de amendoim ou de soja, gordura vegetal parcialmente hidrogenada com origem em soja, palma entre outros. Estes produtos podem aparecer rotulados como “análogo”, “substituto”, “artificial”, “tipo-queijo”, “queijo de imitação”, “extrudido”, “sintético”, “Tofu” e / ou queijo “filled” (Tamime, 2011).

Os análogos do queijo podem ser classificados de acordo com os ingredientes e o processo de fabricação utilizados, designadamente (Figura 1.1): derivados do leite, parcialmente derivados do leite ou não derivados do leite, dependendo se a gordura e os componentes proteicos são de origem animal ou vegetal (Fox *et al.*, 2017). Nos análogos parcialmente derivados do leite, a gordura é maioritariamente óleo vegetal (por exemplo, óleo de soja, óleo de palma, óleo de semente de couve-nabiça e seus equivalentes hidrogenados), enquanto a proteína é de origem láctea (normalmente caseína). Nos análogos não derivados do leite, tanto a proteína como a gordura são obrigatoriamente de origem vegetal (Fox *et al.*, 2000). Os queijos análogos dispensam o passo de maturação.

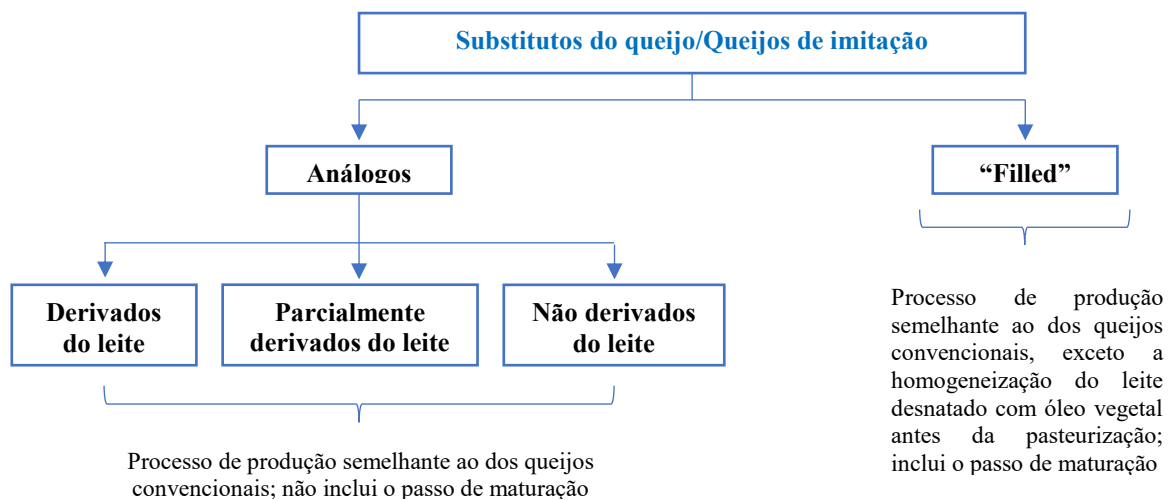


Figura 1.1. Classificação dos queijos de imitação ou de substituição. Adaptado de Fox *et al.* (2017).

O queijo convencional é feito naturalmente com recurso a enzimas de coalho e bactérias do ácido láctico (BAL). O tipo e o grau de fermentação determinam as suas propriedades organoléticas como a textura e o sabor. Dependendo disso, muitos tipos de queijos diferentes podem ser produzidos (Lucey, 2002). Os SQOVs, tal como o queijo tradicional, são caracterizados por serem emulsões sólidas onde os glóbulos de gordura se encontram dispersos num meio contínuo de proteínas, que funcionam como agentes emulsionantes e fornecem a estrutura à matriz que é semelhante à do queijo natural (Bachmann, 2001). São obtidos através da combinação de vários óleos/gorduras, proteínas, e água como ingredientes principais. A sua produção é semelhante à dos outros queijos, mas relativamente mais simples, envolvendo as etapas de formulação, mistura, processamento, embalagem e armazenamento conforme indicado na Figura 1.2 (Masotti *et al.*, 2018; Badem e Uçar, 2016; Fox *et al.*, 2017). A formulação engloba a seleção de ingredientes e suas proporções quantitativas para promover as características organoléticas desejadas no produto final (composição, sabor, textura, entre outros). A sequência de adição de ingredientes pode variar,

mas em geral, a bebida de origem vegetal e os ingredientes secos são mantidos sob agitação, aquecidos a $\sim 50^{\circ}\text{C}$ e misturados. Os ingredientes secos incluem proteínas vegetais, amido (alternativa mais barata) que substitui a caseína do leite, sais emulsionantes (citratos, lactatos, fosfatos e tartaratos, com amônio, potássio ou sódio como contra-íão) e hidrocolóides (goma guar, goma xantana, carragenanas) (Fox *et al.*, 2017; Badem e Uçar, 2016). A mistura pretende-se suave e homogênea, sendo conseguida com a ajuda de calor e agitação (Fox *et al.*, 2017). É recomendado dispersar previamente a caseína e hidratar os ingredientes secos em solução quente, adicionando depois os sais emulsionantes. Este procedimento permite obter um análogo de queijo com a consistência adequada. Após a adição de gordura, a mistura é aquecida a $\sim 85^{\circ}\text{C}$ e é mantida sob agitação até que uma massa homogênea seja formada. Por fim, são adicionados agentes acidificantes (ácidos orgânicos, como os ácidos acético, láctico, cítrico e fosfórico) e agentes aromatizantes (queijo modificado por enzimas, extrato “starter”, extrato de fumo, especiarias) sob agitação (Fox *et al.*, 2017; Badem e Uçar, 2016). Após a etapa de moldagem e embalagem a quente segue-se o armazenamento do produto entre 4 a -4°C (Masotti *et al.*, 2018).

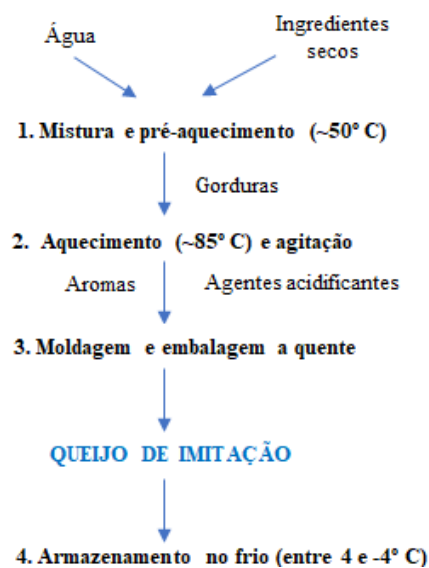


Figura 1.2. Representação esquemática das principais etapas de fabricação de um queijo de imitação. Adaptado de Masotti *et al.* (2018).

Uma etapa adicional de processamento restrita a queijos tipo creme para barrar, de consistência mole, é a homogeneização, que antecede a adição de ácidos e aromas (Guinee, 2011). Essencialmente, este tratamento promove uma maior mistura e uma maior interação entre os ingredientes usados. Nesta etapa de processamento, ingredientes adicionais podem ser introduzidos, tais como: hidrocolóides, corantes, conservantes, sais minerais e vitaminas (Guinee, 2011). É de ter em conta que as condições de cozedura (tempo e temperatura) influenciam as propriedades organolépticas, bem como o prazo de validade do produto final.

Tipicamente, um aumento de temperatura e do tempo de cozedura (Fox *et al.*, 2017) promove um aumento na dureza do análogo de queijo (Mulsow *et al.*, 2007). Deste modo, a formulação e as condições de processamento, tais como o tempo e velocidade de mistura, a temperatura e o tempo de cozedura ou o tipo e a quantidade de sais emulsionantes utilizados, podem ser seleccionados de modo a fornecer aos consumidores um produto final que pode apresentar uma série de sabores, consistências e outras propriedades organoléticas e/ou nutricionais ao produto final (Pereira *et al.*, 2001).

Existe ainda um outro tipo de queijo de imitação, designado por queijo “filled”. O queijo “filled” geralmente difere dos queijos naturais, na medida em que a gordura do leite é parcial ou totalmente substituída por óleos vegetais, que por sua vez podem ser parcialmente hidrogenados para obter um perfil similar ao da gordura do leite. Além disso, o queijo “filled” pode ser produzido usando leite natural desnatado ou usando uma base totalmente sintética. É feito através da dispersão do óleo vegetal no leite desnatado e subsequente homogeneização da mistura, que assegura a emulsificação dos óleos vegetais adicionados, sendo depois submetido à tecnologia convencional de fabrico de queijo, envolvendo o passo de maturação.

Em geral, os análogos de queijo são produzidos em pequenas quantidades, pois os custos de fabrico são mais elevados do que os dos queijos naturais, devido ao custo adicional associado à preparação e reconstituição dos ingredientes (Fox *et al.*, 2017). Apesar disso, o seu processo de fabrico é mais simples do que o dos queijos, por não incluir o passo de maturação (Fox *et al.*, 2017), e podem ser projetados para satisfazer necessidades alimentares especiais através de mudanças na sua formulação (por exemplo, sem lactose, com baixo valor energético, com baixo teor de gorduras saturadas e colesterol e até enriquecimento com vitaminas e minerais) (Chavan e Jana, 2007). Porém, sendo produtos de engenharia, e porque são um produto novo para o qual ainda não existem leis e regulamentos, alguns consumidores permanecem relutantes ao seu consumo (Badem e Uçar, 2016). A definição dos SQOVs não está uniformizada globalmente, sendo útil uma legislação clara para garantir uma rotulagem adequada (Masotti *et al.*, 2018).

1.3. Alimentos tradicionais fermentados à base de plantas

Embora os SLOVs sejam consumidos tradicionalmente há já vários séculos em várias culturas, está a desenvolver-se um novo interesse por tais produtos. No entanto, a maioria deles está disponível apenas no mercado local ou, tradicionalmente, são preparados em casa numa escala muito reduzida a fim de serem fornecidos à família ou à comunidade local

(Blandino *et al.*, 2003). A Tabela 1.2. mostra uma vasta gama de bebidas e produtos fermentados ou não fermentados à base de plantas nativas de todo o mundo.

Os alimentos fermentados tradicionais de origem vegetal são geralmente preparados a partir de cereais como o arroz, trigo, milho ou sorgo. Alguns são usados como corantes, especiarias, bebidas e alimentos para o pequeno-almoço ou refeições leves, enquanto alguns deles são usados como parte principal da dieta.

Tabela 1.2. Alimentos e bebidas tradicionais, fermentado/não fermentado, à base de plantas nativas de todo o mundo (Fontes: Bansal *et al.*, 2016; Prado *et al.*, 2007; Blandino *et al.*, 2003; Oi e Kitabatake, 2003).

Nome	Região	Descrição
Amazake	Japão	Bebida de arroz fermentada doce, sem ou com reduzido teor de álcool
Atole	México	Bebida tradicionalmente preparada com milho
Boza	Bulgária, Albânia, Turquia e Roménia	Bebida fermentada composta por trigo, centeio, milho painço ou milho e outros cereais misturados com açúcar ou sacarina
Bushera	Uganda	Bebida fermentada produzida a partir de milho painço ou sorgo
Chicha	Perú	Bebida fermentada/não fermentada com base em grãos e frutas
Chucrute	Alemanha	Repolho finamente picado e salgado fermentado
Fufu	Nigéria	Pasta fermentada feita à base de amido
Gari	Nigéria	Mandioca fermentada, pasta de amido transformada em mingau
Horchata "leite de tigre"	Espanha	Bebida não fermentada de aparência leitosa
Kimchi, ou gimchi	Coreia	Preparado a partir de vários vegetais fermentados (pepino, rabanete, repolho, cebola verde)
Kombucha	Etiópia	Chá preto ou verde açucarado fermentado com leveduras e bactérias
Koji	Japão	Preparado de cereais cozidos (especial arroz) e legumes fermentados.
Mahewu	África do Sul	Bebida de milho fermentada, não alcoólica
Ogi	Nigéria e África ocidental	Bebida de milho fermentado ou mingau de sorgo
Pozol	Sudeste do México	Bebida fermentada, não alcoólica derivada do milho
Sake	Japão	Bebida fermentada, alcoólica à base de arroz
Suan Tsai ou Suan Cai	China	Produto fermentado feito através de repolho chinês, repolho ou mostarda (também usado como tempero)
Sufu	China	Produto fermentado derivado de soja – conhecido por queijo chinês
Tofu stinky	China	Lanche tradicional chinês feito à base de tofu fermentado com leite fermentado, vegetais e carne

A fermentação no geral é responsável por alterações positivas no que respeita ao prazo de validade, textura, sabor e aroma do produto final. A microbiologia de muitos destes produtos é bastante complexa e desconhecida. Na maioria destes produtos, a fermentação é natural e envolve culturas mistas de leveduras, bactérias e fungos autóctones. O tipo de flora bacteriana desenvolvida em cada alimento fermentado depende de fatores como a atividade da água, o pH, a concentração de sal, a temperatura e a composição da matriz alimentar (Blandino *et al.*, 2003). Alguns microrganismos podem participar em paralelo, enquanto outros agem de forma

sequencial com uma flora dominante em mudança durante o curso da fermentação. As bactérias mais comuns pertencem aos géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Micrococcus* e *Bacillus*. Os géneros de fungos como *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichothecium* são os mais frequentemente encontrados e as leveduras mais comuns são da espécie *Saccharomyces*, responsáveis pela fermentação alcoólica (Blandino *et al.*, 2003). A maioria dos alimentos fermentados depende da ação de bactérias do ácido láctico (BAL), conforme listadas acima, que medeiam o processo de fermentação (Conway, 1996).

Algumas estirpes de BAL têm sido utilizadas como probióticos devido à sua resistência face às condições gastrointestinais do hospedeiro, capacidade de adesão ao epitélio intestinal do hospedeiro e à prevenção do crescimento ou invasão por parte de bactérias patogénicas no intestino (Chiu *et al.*, 2007). Os microrganismos probióticos podem ser definidos como “microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios para a saúde do hospedeiro” (Reid, 2016). Em relação à funcionalidade dos probióticos, acredita-se que para exercer efeitos benéficos, estes devem encontrar-se viáveis e disponíveis em altas concentrações, tipicamente de pelo menos 10^8 - 10^9 UFCs (Unidades Formadoras de Colónia) por grama de produto (Shah, 2001) e devem sobreviver ao suco gástrico humano no estômago, aos sais biliares no intestino delgado e chegar intactos ao intestino delgado e ao cólon (Sanders e Huis in't Veld, 1999). Algumas propriedades benéficas para a saúde humana no que diz respeito a estirpes probióticas que podem ser usadas na indústria alimentar incluem: resistência ao ácido e ao suco biliar; ligação às células epiteliais humanas; colonização do intestino humano; produção de substâncias antimicrobianas, incluindo ácidos orgânicos, peróxido de hidrogénio ou as bacteriocinas (Prado *et al.*, 2008).

Os microrganismos probióticos mais utilizados pertencem principalmente aos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, mas não exclusivamente (Prado *et al.*, 2008). O uso de estirpes de *Bifidobacterium* spp. e/ou de *Lactobacillus acidophilus* em leites fermentados tornou-se popular no final da década de 1970, como resultado do enorme aumento no conhecimento, em particular da taxonomia e da ecologia das bifidobactérias. A sua popularidade aumentou ainda mais devido à redução da acidificação durante o armazenamento e ao rendimento relativamente alto de ácido L(+)-láctico em comparação com o ácido D(-)-láctico (Gomes e Malcata, 1999).

1.4. Leis, interesse governamental e mundial sobre substitutos lácteos

Os produtos alimentares substitutos lácteos são rotulados, com bastante frequência, com os mesmos descritores usados para descrever produtos lácteos recorrendo a termos como leite e queijo para alcançar expectativas familiares no consumidor (criar uma relação de proximidade/familiaridade). Pode uma bebida alternativa ao leite de vaca ser chamada de “leite”? Como a legislação sobre a rotulagem de alimentos varia de país para país, a terminologia utilizada na categorização dos produtos alternativos ao leite à base de plantas tem sido debatida a nível internacional (Sethi *et al.*, 2016; Stall e Adams, 2017).

O leite de soja é rotulado em todo o mundo como "leite de soja", exceto nos países europeus onde a legislação proíbe a utilização da palavra "leite" para bebidas que não são feitas a partir do produto de secreções mamárias (Sethi *et al.*, 2016). O Regulamento do Conselho 1234/2007 regula claramente o termo "leite", para ser utilizado exclusivamente para "a secreção mamária normal obtida de um ou mais mamíferos sem qualquer adição ou extração a partir daí", pelo que atribuir o substantivo “leite” a produtos de origem vegetal pode ser considerado enganoso para os consumidores (Conselho da União Europeia, 2007).

Mais recentemente, o artigo 78º, nº 2, e o Anexo VII, parte III, do Regulamento (UE) nº 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 17 de dezembro de 2013, que estabelece uma organização comum dos mercados dos produtos agrícolas e que revoga os Regulamentos (CEE) nº 922/72, (CEE) nº 234/79, (CE) nº 1037/2001 e (CE) nº 1234/2007 do Conselho, devem ser interpretados no sentido de que se opõem a que a denominação “leite” e as denominações desse regulamento reservadas exclusivamente aos produtos lácteos sejam utilizadas para designar, na comercialização ou na publicidade, um produto puramente vegetal, mesmo que essas denominações sejam completadas por menções explicativas ou descritivas que indiquem a origem vegetal do produto em causa, salvo se o produto constar da enumeração do anexo I da Decisão 2010/791/UE da Comissão, de 20 de dezembro de 2010, que estabelece a lista dos produtos referidos no ponto III, nº 1, segundo parágrafo, do Regulamento nº 1234/2007 do Conselho (Parlamento Europeu e Conselho da UE, 2013).

Projetos como o PROTEIN2FOOD, financiado pela União Europeia (PROTEIN2FOOD, 2015), "The Eatwell Guide", publicação do governo do Reino Unido (England, N.H.S., 2016) e o projeto global “Protein Challenge 2040” fundado para criar uma rede mundial de empresas internacionais e organizações não-governamentais para enfrentar a crescente necessidade de proteínas (Forum for the Future, 2016) são exemplos que demonstram o interesse de diferentes intervenientes em melhorar a consciencialização pública sobre a alimentação, em particular, as proteínas (Jeske *et al.*, 2017). A decisão de compra pelos

consumidores está altamente relacionada com as normas culturais e sociais. A promoção de alimentos à base de plantas e a educação para a saúde e sustentabilidade podem mudar esse ambiente cultural e social (Jeske et al., 2017).

Nos Estados Unidos, a *Food and Drug Administration* (FDA) designa os produtos alternativos ao leite, à base de plantas, como leite de imitação e produtos de imitação do leite e define-os como “os alimentos que têm características físicas, como sabor, aroma, consistência, textura ou aparência do leite ou de produtos lácteos, mas que não se enquadram na definição de " leite " ou " produtos lácteos " e são nutricionalmente inferiores ao produto imitado”. Para além disso, todos os substitutos do leite e produtos lácteos vendidos em lojas devem ser fisicamente separados do leite/produtos lácteos por um divisor ou serem colocados em outra área de exibição e venda (Sethi et al., 2016).

1.5. Impacto no clima e no uso da terra

A adoção de dietas ricas em alimentos vegetais recebeu a atenção de investigadores, nutricionistas e profissionais de saúde nos últimos anos pelo seu potencial, não só na melhoria da saúde, mas também na diminuição do impacto ambiental (Cifelli et al., 2016). A população mundial está a aumentar rapidamente e está a colocar uma enorme pressão sobre os sistemas alimentares de fornecimento de alimentos, o que está a gerar preocupações ao nível da segurança alimentar (Jeske et al., 2017). Estima-se que a população mundial possa atingir 9 bilhões em 2050. Além do aumento da população mundial e da riqueza, outros fatores que impulsionam o consumo mundial de carne incluem a urbanização, a liberalização do comércio, as empresas transnacionais de alimentos, o crescimento do retalho, o marketing das indústrias alimentares e as atitudes e comportamentos dos consumidores (Sabaté e Soret, 2014).

Os sistemas alimentares dependem fortemente dos recursos naturais e o aumento da pressão sobre esses mesmos recursos contribui de forma massiva para muitos dos problemas ambientais de hoje, como são as emissões de gases de efeito estufa (GEE) e a eutrofização, bem como o uso da terra, as mudanças nos solos e a sua acidificação (Jeswani et al., 2015). As emissões de GEE, provenientes principalmente das práticas industrializadas de produção de alimentos, podem advir diretamente das emissões de dióxido de carbono (CO₂) provenientes do uso de combustíveis fósseis em quintas ou na cadeia de abastecimento, das emissões de óxido nitroso (N₂O) resultantes da aplicação de fertilizantes e das emissões de metano (CH₄) provenientes dos animais ou indiretamente como resultado da mudança de uso do solo (Sabaté e Soret, 2014). Para os produtos vegetais, o N₂O é normalmente a emissão

mais importante, bem como para a produção de animais monogástricos (carne de porco, aves), enquanto para os ruminantes, o CH₄ é frequentemente o gás dominante (Sonesson *et al.*, 2010). As emissões diretas e indiretas de GEE resultantes da produção de alimentos são notáveis, já que contribuem entre 19 % e 29 % das emissões antropogênicas globais (Jeswani *et al.*, 2015). De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO), o gado é responsável por 18% das emissões globais de GEE, das quais a produção e o processamento de produtos lácteos contribuem com 4 % (Steinfeld *et al.*, 2006; Gerber *et al.*, 2010).

A terra fértil é um recurso escasso, e os alimentos que requerem grandes áreas de produção são menos sustentáveis mesmo que as emissões diretas sejam baixas. Adicionalmente, a forma como a terra é utilizada pode trazer outros impactos ambientais significativos, como a eutrofização e a perda de biodiversidade (Sonesson *et al.*, 2010). Segundo Sonesson *et al.* (2010), a produção de alimentos vegetais geralmente emite menos GEE por quilograma, e requer menos terra do que a produção de carne e de laticínios. Em comparação com os alimentos vegetais, a carne e os laticínios são claramente responsáveis por uma grande parcela da utilização dos recursos naturais e da carga ambiental da produção de alimentos (Sabaté e Soret, 2014). Pimentel e Pimentel (2003) estabeleceram que, em média, é necessária energia fóssil 11 vezes superior para produzir proteínas de origem animal do que proteínas de origem vegetal para consumo humano. Nas tendências atuais do consumo de alimentos e mudanças ambientais, a segurança alimentar e a sustentabilidade alimentar estão em rota de colisão. É muito provável que a mudança da dieta atual para dietas mais ricas em vegetais, seja uma das soluções para evitar danos ambientais catastróficos, incluindo a mudança climática. Isso ocorre principalmente porque os alimentos de origem animal contribuem de forma massiva para os impactos climáticos originados pelo sistema alimentar, que, por sua vez, constituem uma grande parcela do impacto humano no clima (Cleveland e Gee, 2017).

1.6. Amêndoa

As amêndoas tiveram origem provavelmente na região de clima mediterrâneo do Oriente Médio, no extremo leste do Paquistão e em outras áreas da Ásia Menor. Nos tempos antigos, elas foram espalhadas especialmente pelos fenícios e romanos através do Mediterrâneo para o norte da África e sul da Europa e, mais recentemente, foram transportadas para outras partes do mundo (Salas-Salvadó *et al.*, 2010). A amêndoa é um dos frutos secos/oleaginosos mais populares em todo o mundo. Tendo em conta o estilo de vida moderno agitado, os frutos oleaginosos parecem ser um *snack* rápido, conveniente, saboroso e nutritivo que pode contribuir para um estilo de vida mais saudável, desde que consumido adequadamente

(porção média de 28-32g por dia). As amêndoas podem ser consumidas inteiras (cruas, tostadas, salgadas) ou laminadas, podendo ser usadas quer como ingrediente numa grande variedade de alimentos processados, como produtos de panificação e confeitaria. Já o seu óleo pode ser extraído e utilizado para vários propósitos culinários ou, ainda, como componente de produtos cosméticos. (Dourado *et al.*, 2004; Alasalvar e Shahidi, 2008; Yada *et al.*, 2011).

Existem dois tipos de amêndoa: a doce e a amarga (Kamil e Chen, 2012). As amêndoas amargas fornecem o óleo de amêndoa amarga, que é usado como ingrediente em produtos cosméticos (Salas-Salvadó *et al.*, 2010). A sua característica amarga deriva da presença do glicosídeo cianogénico, a amigdalina, que se torna tóxico devido à ação catabólica de enzimas intracelulares como a beta-glucosidase libertadas durante a mastigação, originando a libertação de cianeto (Kamil e Chen, 2012; Jain *et al.*, 2018). Devido à presença de vestígios de cianeto na ordem das 469 mg de amigdalina por 100 g de amêndoa (Jain *et al.*, 2018), a amêndoa amarga é considerada tóxica para os seres humanos, podendo ser letal. No entanto, a toxicidade do cianeto é destruída pelo calor e pelo processamento (Kamil e Chen, 2012).

A amêndoa doce (*Prunus dulcis*) pertence à família Rosaceae, cresce em inúmeras regiões temperadas e sub-tropicais (Gradziel, 2017) e é comumente consumida em todo o mundo. Outros sinónimos listados para esta espécie de amendoeira incluem *Prunus amygdalus* Batsch e *Prunus communis* L., bem como a designação inicial *Amygdalus communis* L. (Yada *et al.*, 2011). Em termos botânicos a amêndoa é uma drupa composta por um exocarpo fino e duro que envolve o mesocarpo verde fibroso/carnudo e o endocarpo endurecido que, por sua vez reveste a semente, isto é, a parte comestível (Figura 1.3).

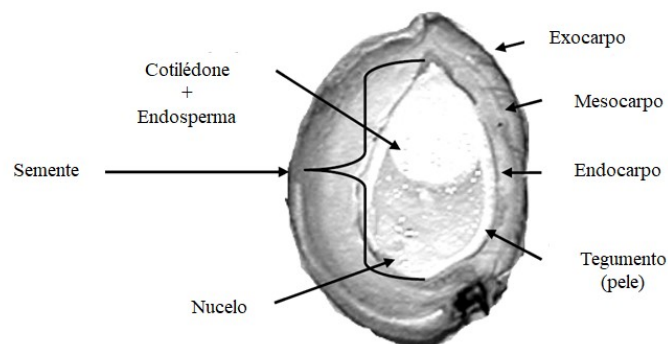


Figura 1.3. Estrutura anatómica da amêndoa. Adaptado de Martínez-Gómez *et al.* (2008).

A semente é constituída por: um tegumento fino com função de proteção contra perdas de água e ataques de insetos; um embrião formado por dois cotilédones volumosos (maior parte do peso da semente), uma pequena radícula e uma plúmula; e um tecido de reserva chamado endosperma (Rosengarten Jr, 2004, Dourado *et al.*, 2004 Pascual-Albero *et al.*, 1998). O tegumento da amêndoa é estruturalmente complexo, sendo formado por tecido celulósico

lignificado (Dourado *et al.*, 2004). Segundo Saura-Calixto *et al.* (1983), este revestimento contém 21 % de celulose, 12 % de hemicelulose, 10 % de lignina e 1,4% de lípidos (m/m, peso seco). As quantidades de açúcares monoméricos presentes na pele da amêndoa (como percentagem do teor total de açúcares) segundo Mandalari *et al.* (2010a) são: ácido galacturónico (36 %), glicose (29 %), arabinose (18 %) e xilose (8 %), em que manose, ramnose e fucose também estão presentes mas em menores quantidades. Já as células cotiledonares do embrião possuem uma constituição heterogénea que engloba um elevado número de proteínas e corpos lipídicos, alguns dos quais apresentando fitina (inositol hexafosfato de cálcio e magnésio) na sua constituição. Os corpos lipídicos são os principais locais de armazenamento de lípidos em células de sementes oleaginosas. As reservas de lípidos ocorrem sob a forma de triacilgliceróis em corpos lipídicos ou esferossomas (Dourado *et al.*, 2004).

1.6.1. Amêndoa: Propriedades nutricionais e alimentos funcionais

Nos últimos anos, as fontes vegetais têm sido indicadas como alimentos funcionais, isto é, alimentos que, além de fornecerem nutrientes, fornecem ao organismo componentes que contribuem para o tratamento das doenças ou reduzem o risco de desenvolvê-las (Prado *et al.*, 2008), devido à presença de componentes promotores da saúde, como fibras alimentares, sais minerais, vitaminas e antioxidantes na sua composição (Das *et al.*, 2012). O desenvolvimento de alimentos funcionais com ingredientes benéficos para a saúde está em expansão devido ao facto do seu consumo ser associado a uma redução do risco de contrair determinadas doenças crónicas. Fibras ou extratos ricos em polifenóis, assim como alimentos são muito conhecidos como tendo benefícios para a saúde humana, como por exemplo as bagas goji e o cacau (Martins e Chen, 2017). A composição nutricional média da amêndoa com e sem pele (branqueada) encontra-se descrita na Tabela 1.3.

As amêndoas têm vindo a ganhar destaque pelos múltiplos benefícios para a saúde, por serem ricas em proteínas, ácidos gordos monoinsaturados, fibras dietéticas, vitamina E, riboflavina, minerais essenciais, fito esteróis e polifenóis (Kendall *et al.* 2010; Yada *et al.*, 2013). As fibras e os polifenóis presentes na pele da amêndoa têm propriedades moduladoras de bactérias benéficas que ajudam a manter/promover a saúde intestinal, funcionando como compostos prebióticos (Martins e Chen, 2017). Os prebióticos ou compostos com atividade prebiótica são nutrientes, ingredientes, ou alimentos resistentes às enzimas digestivas, que promovem o crescimento seletivo de bactérias benéficas, promovendo a saúde do hospedeiro (Martins e Chen, 2017). Existe um grande conjunto de evidências clínicas que mostram que o

consumo de amêndoa é inversamente associado a vários fatores de risco para doenças crônicas como dislipidemia, hiperglicemia, inflamação e excesso de peso/obesidade, e também, para o *stress* oxidativo (Martins e Chen, 2017).

Tabela 1.3. Composição média nutricional da amêndoa com e sem pele (branqueada).¹

Nutrientes por 100g	Amêndoa com pele	Amêndoa sem pele
Água (g)	4,41	4,51
Energia (kcal/kJ)	579/2423	590/2468
Proteína (g)	21,15	21,40
Lípidos totais (g)	49,93	52,52
Ácidos gordos saturados (g)	3,80	3,953
Ácidos gordos mono-insaturados (g)	31,55	33,42
Ácidos gordos poli-insaturados (g)	12,33	12,37
Carboidratos por diferença (g)	21,55	18,67
Fibra dietética total (g)	12,5	9,9
Açúcares totais (g)	4,35	4,63
Sacarose (g)	3,95	4,46
Glucose (dextrose) (g)	0,17	0,03
Maltose (g)	0,04	0,14
Frutose (g)	0,11	0,00
Minerais		
Cálcio (mg)	269	236
Ferro (mg)	3,71	3,28
Magnésio (mg)	270	268
Fósforo (mg)	481	481
Potássio (mg)	733	659
Sódio (mg)	1,00	19
Zinco (mg)	3,12	2,97
Cobre (mg)	1,03	1,03
Manganês (mg)	2,18	1,84
Selênio (µg)	4,1	3,2
Vitaminas		
Tiamina (mg)	0,21	0,19
Riboflavina (mg)	1,14	0,71
Niacina (mg)	3,62	3,50
Ácido pantoténico (mg)	0,47	0,31
Vitaminas B-6 (mg)	0,14	0,12
Folatos totais (µg)	44	49
Vitamina A (IU)	2	7
Vitamina E		
α-tocoferol (mg)	25,63	23,75
β-tocoferol (mg)	0,23	0,35
γ-tocoferol (mg)	0,64	0,66
δ-tocoferol (mg)	0,07	0,20
Aminoácidos		
Arginina (g)	2,47	2,48
Ácido aspártico (g)	2,64	2,75
Ácido glutâmico (g)	6,21	5,21

¹Dados da United States Department of Agriculture (USDA) para Referência padrão (<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/>)- Acesso a informação em outubro de 2018.

1.6.1.1. Propriedades antioxidantes

As amêndoas também são ricas em compostos com atividade antioxidante, como o resveratrol (um polifenol presente principalmente em uvas e vinho tinto), kaempferol, quercetina, catequina e epicatequina (Capurso *et al.*, 2018). Muitos dos compostos antioxidantes presentes nas amêndoas estão concentrados no tegumento. De acordo com Blomhoff *et al.* (2006), a amêndoa sem pele contém cerca de 0,112 mmol/100g de conteúdo antioxidante total, enquanto a amêndoa com pele contém cerca de 0,412 mmol/100g. Assim sendo, as amêndoas devem ser comidas com a pele para maximizar os benefícios à saúde em termos de propriedades antioxidantes. A combinação do seu alto conteúdo em vitamina E com os compostos antioxidantes presentes na pele da amêndoa providencia efeitos sinérgicos contra a oxidação lipídica (Chen *et al.*, 2005). Estruturalmente, a vitamina E inclui oito moléculas quimicamente distintas: os tocoferóis (α -, β -, γ -, δ -T) e tocotrienóis (α -, β -, γ -, δ -T3). Está bem estabelecido que estas oito isoformas da vitamina E são antioxidantes e têm papéis protetores em sistemas biológicos, possuindo também propriedades hipocolesterolémicas, anticancerígenas e neuroprotetoras (Sen *et al.*, 2007). O α -tocoferol é o composto funcionalmente ativo da vitamina E, e é utilizado preferencialmente no corpo humano em relação às outras formas (Brigelius-Flohe' *et al.*, 2002), sendo um poderoso antioxidante que desempenha um papel importante na proteção contra a ação de radicais livres (Sethi *et al.*, 2016). Uma dose de 28 g de amêndoas constitui uma excelente fonte de manganês e α -tocoferol, contendo mais de 20 % do seu valor diário (Kamil e Chen, 2012).

1.6.1.2. Redução do colesterol e do risco de doenças cardiovasculares

A prevalência de doenças cardiovasculares está a aumentar em todo o mundo e é a principal causa de morte nos países industrializados e em muitos dos países em desenvolvimento. Inicialmente, por terem elevado teor de gordura, as amêndoas não eram vistas como saudáveis do ponto de vista das doenças coronárias. No entanto, hoje sabe-se que o perfil nutricional das amêndoas revela um padrão de ingestão consistente com a maioria das recomendações alimentares e que promovem efeitos benéficos para a saúde do coração (Chen *et al.*, 2006). Tem sido demonstrado que as amêndoas têm um papel benéfico no controlo dos níveis de colesterol no sangue, perfil lipídico e lipoproteínas em diferentes populações incluindo indivíduos saudáveis e pacientes com hipercolesterolemia e diabetes tipo 2 (Kamil e Chen, 2012; Martins e Chen, 2017).

A energia providenciada pelas amêndoas deriva em grande parte do seu conteúdo em gordura (25-60 g/100 g peso fresco). Uma porção de 100 g de amêndoas contém cerca de 50 g de

gordura a maioria da qual (40 g) é constituída por ácidos gordos monoinsaturados e ácidos gordos polinsaturados (Yada *et al.*, 2011; Kalita *et al.*, 2018), contribuindo, desta forma, para baixar o índice glicémico (Kendall *et al.*, 2010; Kamil e Chen, 2012). Os ácidos oleico e linoleico, são responsáveis por cerca de 90% dos lipídios totais, sendo o ácido oleico o ácido gordo predominante (Yada *et al.*, 2011; Aydin, 2003). Além disso, as amêndoas não possuem colesterol na sua composição.

Uma ingestão diária de amêndoas parece exercer um efeito benéfico no perfil lipídico, já que numerosos estudos mostram que uma dieta rica em amêndoas diminui significativamente o colesterol LDL (lipoproteínas de baixa densidade) (conhecido como um fator de risco de doenças cardiovasculares) e mantém os níveis de colesterol HDL (lipoproteínas de elevada densidade) (Kalita *et al.*, 2018). Três estudos com amêndoas mostraram que uma dieta contendo 50 a 100 g de amêndoas por dia diminuiu significativamente o colesterol total entre 4 e 16 % e o LDL-C (7 a 19 %) em doentes hipercolesterolémicos (Spiller *et al.*, 1998; Jenkins *et al.*, 2003) e indivíduos normocolesterolémicos (Sabaté *et al.*, 2003) em comparação com indivíduos que consumiram uma dieta controlo com gordura de origem láctea, uma dieta com baixo teor de gordura e uma dieta sem amêndoas, respetivamente).

1.6.1.3. Propriedades anti-inflamatórias, supressão da fome e redução da obesidade

A epidemia da obesidade e excesso de peso é um problema global, uma vez que está intimamente associada ao aumento da prevalência da síndrome metabólica, diabetes do tipo 2 e doenças cardiovasculares que têm sérias implicações nos sistemas de cuidados de saúde e no custo financeiro para os indivíduos e países (Martins e Chen, 2017). Por ser alimento rico em gordura, as amêndoas, tendem a ser associadas ao aumento de peso corporal. Fraser *et al.* (2002) realizaram um estudo em que testaram a hipótese de que um suplemento diário de uma quantidade de amêndoas correspondente a 320 calorias (aproximadamente duas mãos cheias) durante 6 meses, sem conselhos dietéticos, não alteraria o peso corporal dos indivíduos testados (25-70 anos). Os resultados mostram que o aumento de peso médio não foi significativo (0,4 kg) e não houve alteração na cintura/quadril. A ausência de efeito foi atribuída ao facto de a energia extra das amêndoas ter induzido a redução do consumo de outros alimentos, às propriedades saciantes das amêndoas e à absorção incompleta de gorduras provenientes das amêndoas. Noutro estudo, Holis *et al.* (2016) escolheram aleatoriamente 30 voluntários sem doenças crónicas de ambos os sexos para participar no seu estudo. Os resultados mostraram que a substituição diária de uma porção de produto lácteo

por um copo (240 mL) de bebida de amêndoa diminuiu significativamente o peso corporal, o índice de massa corporal (IMC) e a circunferência da cintura e do quadril num período de 4 semanas.

Apesar das amêndoas possuírem um elevado teor em lípidos, estes não são tão bio-acessíveis e permanecem indisponíveis durante todo o processo de digestão, devido a barreiras estruturais das paredes celulares da semente que impedem a penetração de enzimas digestivas (Grundy *et al.*, 2015). Ellis *et al.* (2004) constatou que as paredes celulares das sementes da amêndoa reduzem a bio-acessibilidade lipídica, dificultando a libertação de lípidos disponíveis para a digestão. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Zemaitis e Sabaté (2001) que indicaram um aumento da excreção de lípidos em pessoas que consomem amêndoas, facto atribuído à presença de paredes celulares intactas nas fezes, dificultando a digestão dos lípidos intracelulares (Ellis *et al.*, 2004).

“Food displacement effect” é um processo descrito como o aumento da saciedade e sensação de satisfação alimentar que leva à diminuição da fome após o consumo de amêndoas (Sweazea *et al.*, 2014). Cassady *et al* (2009) observou que como se trata de um alimento duro, as amêndoas podem exigir um maior tempo de mastigação, que por sua vez aumenta a libertação de lípidos no intestino, que conseqüentemente levará à secreção de hormonas como a colescistoquina (CCK), peptído tipo glucagina-1 (GLP-1), glucagon-like peptide-1 e péptido YY (péptido inibidor do apetite entre refeições, produzido no trato digestivo), que são conhecidas por aumentar a saciedade e suprimir, assim, a sensação de fome. O maior esforço mecânico oral exigido na sua deglutição pode aumentar a saciedade, também através de mecanismos neurais, já que a mastigação constitui um estímulo chave das respostas da fase cefálica. As amêndoas podem limitar a absorção de nutrientes e manter a saciedade/suprimir a fome, tendo também um conteúdo de energia metabolizável baixo. Os seus benefícios no peso corporal podem ser estendidos à composição corporal. Durante o processo de perda de peso, a redução da gordura corporal, especialmente na área central abdominal é a mais beneficiada em comparação com a perda de gordura subcutânea (Martins e Chen, 2017).

Devido ao seu perfil nutricional, também tem sido demonstrado que a ingestão de amêndoas apresenta uma relação com a diminuição da inflamação quer por via direta quer por via indireta. Caracterizar quais os nutrientes que são responsáveis por essa diminuição é um desafio no que diz respeito a um alimento completo. As vitaminas, os antioxidantes, as fibras, a L-arginina, o magnésio, e os fitoquímicos presentes nas amêndoas podem também exercer, em conjunto, ações anti-inflamatórias (Martins e Chen, 2017). A proteína C-reativa é considerada um marcador pró-inflamatório que pode prever o risco cardíaco (Asegaonkar *et*

al., 2011). Dados de Sweazea *et al.* (2014) demonstraram que a ingestão diária de amêndoa com pele na ausência de outras modificações alimentares ou físicas é benéfica na redução da inflamação em indivíduos com diabetes tipo 2, uma vez que neste estudo, a proteína C-reativa como biomarcador inflamatório foi significativamente reduzida no grupo de indivíduos com diabetes tipo 2 que consumiram amêndoas relativamente ao grupo controlo que manteve uma dieta normal sem incorporação de amêndoas.

1.6.1.4. Propriedades prebióticas

As fibras alimentares (FAs) são polímeros de hidratos de carbono que constituem uma porção indigerível nos alimentos e que se podem dividir em fibras solúveis e insolúveis em água. De acordo com a *American Association of Cereal Chemists* (AACC), o termo "fibra alimentar" (FA) geralmente inclui a mistura complexa de polissacarídeos indigeríveis (celulose, hemiceluloses, oligossacarídeos, pectinas, gomas, ceras) e lignina encontrada em plantas, principalmente como material constituinte da parede celular da planta (AACC, 2001). As FAs constituem uma mistura de compostos que incluem polissacarídeos não amiláceos (PNAs), amido e oligossacarídeos que são resistentes à digestão (Marshall *et al.*, 2017). No que respeita à amêndoa, as paredes celulares do tegumento são ricas em PNAs, particularmente ricas em arabinose, contendo elevadas concentrações de compostos fenólicos (Ellis *et al.*, 2004). Uma das potenciais propriedades prebióticas das amêndoas é atribuída à arabinose que está relacionada com a diminuição do nível de colesterol (Sethi *et al.*, 2016). Os açúcares, os amidos e os PNAs são os hidratos de carbono tipicamente encontrados nas sementes e outros tecidos vegetais. Destes hidratos de carbono em amêndoas, apenas os açúcares, o amido e alguns álcoois de açúcar podem ser digeridos, absorvidos e metabolizados pelos seres humanos. Os PNAs são indigeríveis e, portanto, não estão disponíveis como fonte de energia, mas promovem efeitos fisiológicos que são benéficos para a saúde humana (Yada *et al.*, 2011). As FAs têm um papel fundamental pois auxiliam na prevenção contra várias doenças, sobretudo as associadas ao estilo de vida moderno, como a obesidade e os distúrbios metabólicos tais como obstipação, diverticulose, diabetes tipo 2, hipercolesterolemia, cancro, osteoporose e obesidade (Martins e Chen, 2017). Com base nas evidências existentes sobre a função intestinal, é recomendado a ingestão de 25 g de FAs por dia (Tetens, 2011).

As amêndoas são um dos alimentos mais ricos em FAs, contendo cerca de 3,4 g em 28 g de amêndoa, providenciando uma quantidade considerável de fibra para a fermentação bacteriana no intestino (Martins e Chen, 2017). Mandalari *et al.* (2010b) investigaram o efeito prebiótico de amêndoas *in vitro* recorrendo a uma mistura de culturas de bactérias fecais, e observaram

que após digestão gástrica e duodenal *in vitro*, as amêndoas com e sem pele aumentaram significativamente as populações de bifidobactérias e de *Clostridium coccoides/Eubacterium rectale*, resultando num índice prebiótico (relação comparativa entre o crescimento de bactérias “benéficas (como bifidobactérias, lactobacilos e *E. rectale*), e as “menos desejáveis”, (como *Clostridium* e *Bacteroides*), em relação às mudanças no número total de bactérias) de 3.2 para amêndoas com pele e de 3.3 para amêndoas sem pele equiparando-se à ação de fructooligossacarídeos (FOS) prebióticos comerciais com um índice de 4.2 após 24 h de incubação. De acordo com os autores, não foram detetadas diferenças significativas na proporção dos grupos de bactérias intestinais assim como na produção de ácidos gordos de cadeia curta após digestão de amêndoas com e sem pele, mostrando que os polifenóis presentes na pele das amêndoas não afetaram de forma significativa a fermentação bacteriana. Para além disso, as amêndoas com ou sem pele promoveram o aumento da atividade da β -galactosidase, que é principalmente sintetizada por bifidobactérias e lactobacilos, e a diminuição da atividade da β -glucuronidase, nitroreductase e azotoreductase, que são sintetizadas por bactérias prejudiciais, sugerindo uma mudança favorável no perfil bacteriano (Liu *et al.*, 2014; Martins e Chen, 2017). As peles das amêndoas resultantes do branqueamento industrial constituem 4-8 % do peso total das amêndoas descascadas e são consideradas subprodutos, que, se não forem processados, são descartados como resíduos. No entanto, estes resultados mostram que as peles podem ser reaproveitadas como potenciais prebióticos (Mandalari *et al.*, 2010b).

De realçar que o leite é uma fonte concentrada de nutrientes com alta digestibilidade e é puramente desprovido de FAs. Deste modo, a FA é por vezes adicionada ao leite e aos produtos lácteos, seja por questões de saúde, benefícios tecnológicos ou por razões sensoriais. A FA pode ser incorporada no leite e produtos lácteos na forma de fibras purificadas ou na forma de uma fonte rica em fibras. Entre as fontes concentradas comercialmente disponíveis de FA, a inulina é a mais pesquisada principalmente por causa da sua solubilidade, cor e sabor (Arora *et al.*, 2015). A bebida de amêndoa contém aproximadamente 0,64 g de fibra em 240 mL (Tabela 1.1).

1.7. Aproveitamento de subprodutos da amêndoa

Embora a semente da amêndoa seja mais relevante em termos comerciais e nutricionais, a atenção dirigida a outras partes deste fruto, como a pele (tegumento), o endocarpo e o mesocarpo têm vindo a aumentar. Estes subprodutos são, ainda, sub-explorados em relação às suas potenciais propriedades benéficas nomeadamente como fontes de compostos bioativos

(ex. ácidos fenólicos e flavonóides). No entanto, podem ter novas aplicações como por exemplo sob a forma de ingredientes funcionais que poderão por um lado enriquecer a composição nutricional e por outro acrescentar mais-valia em termos de propriedades biológicas nos alimentos onde são incorporados (Prgomet *et al.*, 2017).

Os polifenóis estão presentes maioritariamente na pele das amêndoas e exibem uma gama de bioactividades que incluem atividades antioxidante, anti-inflamatória e, antidiabética (Martins e Chen, 2017). Dentro dos flavonoides, os flavanois e os glicosídeos de flavonol são os mais abundantes, entre 38-57 % (m/p) e 14-35 % (m/p) do total de polifenóis, respetivamente (Martins e Chen, 2017). Deste modo, os seus extratos polifenólicos podem prevenir doenças degenerativas ligadas ao *stress* oxidativo e à inflamação de tecidos e células humanas. Tal como no caso dos efeitos anti-inflamatórios benéficos, os efeitos antioxidantes das amêndoas podem dever-se a uma redução no stress oxidativo secundário. O potencial antioxidante destes subprodutos pode ter várias aplicações tais como: aditivos naturais para conservação de alimentos, ou suplementos dietéticos/nutracêuticos na indústria farmacêutica e cosmética (Prgomet *et al.*, 2017). Para além destas aplicações, estes subprodutos, se processados e utilizados de forma eficaz podem fornecer uma quantidade substancial de calor e energia necessária para a manipulação e o processamento das amêndoas. A utilização desses subprodutos de amêndoa poderá aumentar, deste modo, a sustentabilidade das indústrias de produção e processamento da amêndoa (Chen *et al.*, 2010).

1.8. Aproveitamento dos coprodutos resultantes da produção da bebida de amêndoa e análogos de queijo

O resíduo proveniente do fabrico da bebida de amêndoa, apesar de ainda ser pouco caracterizado e estudado quanto ao seu valor nutricional, pode ser incorporado em alguns produtos alimentares sendo já sugerida a sua inclusão em receitas culinárias. Existem atualmente uma variedade grande de receitas com potencial para serem exploradas, que incluem *snacks*, bolachas, biscoitos, bolos, pão, *smoothies*, hummus, e até cremes para barrar (Homespun capers, 2016; Low tox life, 2014; Flo and grace, 2011, The raw food mum, 2013, ChubbyVegan, 2013). Este resíduo pode ser seco ou hidrolisado e transformado em pó tipo “farinha”. Gilmore (2015) afirma que o resíduo proveniente da bebida de amêndoa, ainda mantém muitas das suas propriedades nutricionais, inclusive gorduras monoinsaturadas, que são associadas a uma diminuição do risco de doença cardíaca, e fibras de fácil digestão. Futuramente, e dada a inexistência de evidência científica, seria importante caracterizar de

forma mais extensiva este resíduo sob o ponto de vista nutricional e biológico explorando os seus potenciais compostos bioativos.

A doença celíaca é uma patologia que afeta o intestino delgado e que depende de um processo imunológico que pode aparecer durante a infância ou na vida adulta, desenvolvendo-se numa intolerância permanente ao glúten (Granato *et al.*, 2010). O glúten é um conjunto de proteínas encontradas no trigo, na cevada, no centeio, na aveia e em outros cereais. Devido às suas propriedades únicas coesivas e elásticas, esta proteína permite formar a massa para produzir biscoitos, pão, bolos e outros produtos de panificação (Wall e Huebner, 1981). Sintomas como fraqueza, perda de peso e diarreia devido à má absorção de nutrientes no intestino delgado podem ser desenvolvidos em celíacos que consumam glúten. Por isso, tornou-se cada vez mais necessário o desenvolvimento de novos produtos para celíacos, alérgicos ao leite de vaca e a fenilcetonúricos, por isso a procura por outros ingredientes como o resíduo proveniente do fabrico do leite de amêndoa é cada vez mais importante (Granato e Ellendersen, 2009).

Um outro coproduto da amêndoa que deve ser alvo de estudos é o soro proveniente da produção de “queijo” de amêndoa tipo fresco, sobre o qual ainda não existe informação quanto ao seu perfil nutricional mas que poderá ser interessante e mais uma forma de se aumentar a sustentabilidade do uso de um recurso natural como é a amêndoa promovendo desta forma a economia circular.

1.9. Objetivos e layout da tese

Este trabalho teve como principais objetivos a caracterização microbiológica, química e biológica de bebida de amêndoa e de dois coprodutos do processamento da amêndoa, nomeadamente o resíduo resultante da produção da bebida de amêndoa (designado daqui em diante por resíduo de amêndoa) e o soro resultante da produção de queijo de amêndoa tipo fresco (designado daqui em diante por soro de amêndoa), fabricados pela empresa Yogan e sua aplicação na formulação e produção de novos alimentos. Tendo em conta que tanto o conhecimento sobre as características microbiológicas, químicas e biológicas do resíduo e do soro de amêndoa bem como a sua aplicação na formulação de alimentos é ainda relativamente escasso, estabeleceram-se os seguintes objetivos específicos:

i) Efetuar a caracterização microbiológica da bebida e dos coprodutos de amêndoa no que respeita à identificação e contagem de células viáveis de mesófilos e psicrófilos totais, bolores e leveduras, *Staphylococcus aureus*, bactérias lácticas, enterobactérias e enterococos;

- ii) Efetuar a caracterização química da bebida e dos coprodutos de amêndoa no que respeita ao teor de acidez titulável, teor de hidratos de carbono, proteína e gordura total e perfil de ácidos gordos totais;
- iii) Avaliar o potencial biológico da bebida e dos coprodutos de amêndoa no que respeita a atividades prebiótica, antioxidante e antidiabética;
- (iv) Formulação, produção e caracterização (microbiológica, química e biológica) de bebidas fermentadas à base de bebida de amêndoa e soro de amêndoa com *Bifidobacterium lactis* BB-12 e *Streptococcus thermophilus*;
- (iv) Formulação, produção e caracterização (microbiológica, química e biológica e sensorial) de creme para barrar à base de resíduo de amêndoa.

Na Figura 1.4. encontra-se descrita a representação esquemática da tese e do respetivo trabalho experimental desenvolvido.

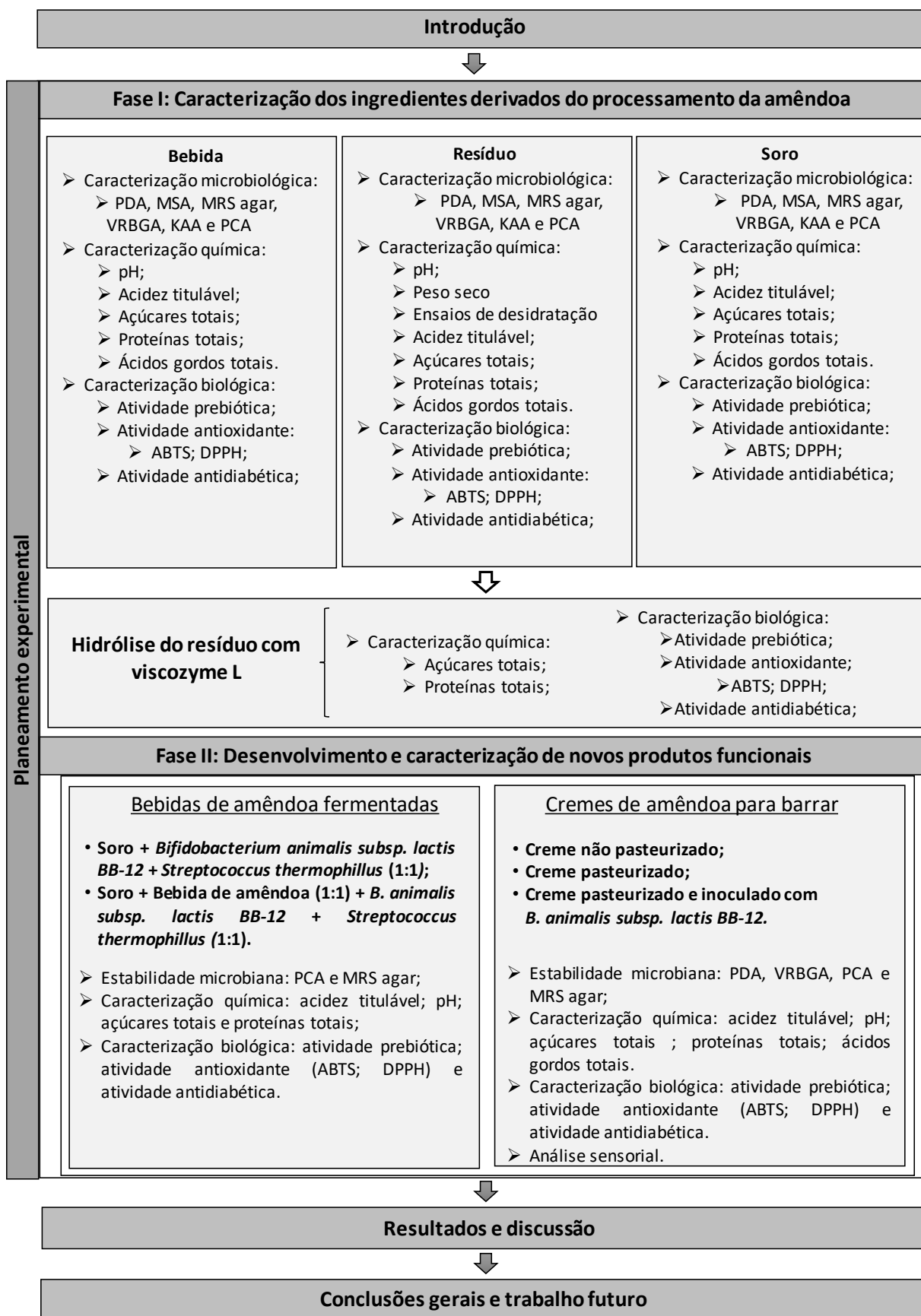


Figura 1.4. Representação esquemática da estrutura da tese ne do trabalho experimental desenvolvido.

2. Materiais e métodos

No período entre outubro de 2017 e julho de 2018 (Tabela 2.1) foram fornecidas várias amostras de bebida de amêndoa, de resíduo resultante da produção de bebida de amêndoa (resíduo de amêndoa) e de soro resultante da produção de queijo de amêndoa tipo fresco (soro de amêndoa) produzidos pela empresa Yogan[®].

Tabela 2.1. Amostras recolhidas entre outubro de 2017 e julho de 2018 de bebida de amêndoa, resíduo de amêndoa e soro de amêndoa.

Amostragem	Mês	Bebida de amêndoa	Resíduo de amêndoa	Soro de amêndoa
1	novembro	X	NA	NA
2	fevereiro	X	x	x
3	fevereiro	X	x	NA
4	abril	X	x	x
5	abril	X	NA	NA
6	julho	X	NA	x

NA: não aplicável (amostra não fornecida)

Em termos de apresentação, a bebida de amêndoa possui um aspeto leitoso enquanto o soro de amêndoa é mais aguado, contendo alguns vestígios de queijo tipo fresco (Figura 2.1). O resíduo, originado a partir do fabrico da bebida de amêndoa, tem o aspeto de uma pasta esbranquiçada de consistência maleável. Tanto a bebida como os coprodutos possuíam um aroma típico de amêndoa.



Figura 2.1. Amostras de bebida de amêndoa(a), resíduo de amêndoa (b) e soro de amêndoa (c).

Na produção de bebida de amêndoa, as amêndoas sem pele, são trituradas e espremidas, resultando em duas fases, uma fase aquosa que constitui a bebida de amêndoa propriamente dita e uma outra fase sólida que dá origem ao resíduo de amêndoa. O soro por sua vez é um coproduto originado do fabrico do queijo de amêndoa tipo fresco, que é o equivalente ao soro doce que se obtém através da produção de queijo fresco de origem láctica.

Tanto a bebida de amêndoa como os dois coprodutos foram devidamente acondicionados e enviados para o laboratório sob refrigeração. Aquando da sua receção procedeu-se à divisão das amostras em várias alíquotas que foram de seguida congeladas para futura caracterização química e biológica assim como formulação e produção de alimentos. A caracterização microbiológica foi efetuada de imediato aquando da sua receção sob a forma refrigerada.

2.1. Caracterização dos ingredientes derivados do processamento da amêndoa

2.1.1. Caracterização microbiológica e pH

Sob condições assépticas, 4 g de cada amostra (bebida, resíduo e soro) foram pesadas, transferidas para um matraz e diluídas e seguidamente homogeneizadas em 40 mL de água peptonada estéril contendo peptona (0,1 %, m/v) e NaCl (0,85 %, m/v) durante 1 min num aparelho Stomacher® (Modelo 400 Circulator). Foram realizadas de seguida, diluições decimais sequenciais (até 10^{-6}) por diluição de 1 mL de cada amostra em 9 mL de água peptonada com NaCl. Posteriormente, procedeu-se ao plaqueamento, em duplicado, de alíquotas de 20 μ L, pelo método da gota (Miles e Mirsa, 1938) nos meios de cultura referidos na Tabela 2.2, à exceção do meio VRBGA que foi inoculado por incorporação (1 mL).

Tabela 2.2. Meios de cultura seletivos e diferenciais e respetivas condições de incubação para os diferentes grupos de microrganismos analisados.

Microrganismos	Meios de Cultura	Atmosfera	Incubação
Mesófilos totais	Plate Count Agar (PCA, Biokar, França)	Aerobiose	3-5d; 30°C
Psicrófilos totais	Plate Count Agar	Aerobiose	3-5d; 20°C
Bolores e leveduras	Potato Dextrose Agar (PDA, Biokar, França)	Aerobiose	2-7 d; 25°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	Manitol Sal Agar (MSA, Biokar, França)	Aerobiose	24h; 35°C
Bactérias lácticas	deMan, Rogosa e Sharpe agar (MRS agar, Biokar, França)	Anaerobiose	48h; 37°C
Enterobactérias	Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA, Oxoid, Reino Unido)	Aerobiose	24-48h; 37°C
Enterococos	Kanamycin Esculin Azide Agar (KAA agar, Biokar, França)	Aerobiose	24h; 37°C

Por último, as placas de petri inoculadas foram incubadas nas condições referidas na Tabela 2.2. As placas com MRS agar foram incubadas em jarras de anaerobiose contendo um sistema de geração de atmosfera anaeróbia (GasPak EZ, BD, EUA) ou na câmara de anaerobiose (DG250, Whitley, Reino Unido). Em todas as amostras, o valor de pH foi medido, em duplicado, com recurso a um potenciómetro (Micro pH 2002, Crison, Espanha).

2.1.2. Peso seco e ensaios de desidratação

Inicialmente foram colocados cadinhos na estufa a 100 °C durante 1 h. Após arrefecimento, os cadinhos vazios foram tarados. De seguida, pesaram-se em duplicado os cadinhos com as amostras de resíduo húmido, desidratado e desidratado moído, que foram, de novo colocados na estufa a 100 °C durante 4-5 h até peso constante. Ao fim desse tempo os cadinhos com as amostras foram retirados da estufa e pesados a frio. A percentagem de humidade foi deduzida a partir do cálculo da percentagem de peso seco que foi calculada a partir da seguinte equação (Equação 2.1):

$$\text{Peso seco (\%)} = \frac{\text{Peso amostra seca (g)} \times 100}{\text{Peso amostra húmida (g)}} \quad 2.1$$

Com o intuito de desidratar o resíduo foi usado um desidratador (3900, Excalibratur, EUA) a uma temperatura de 52 °C com uma circulação de ar contínua. Este resíduo foi distribuído o mais uniformemente possível por tabuleiros com papel vegetal picotado para providenciar uma melhor circulação do ar e de modo a ficar com cerca de 3-4 mm de espessura.

As folhas de papel vegetal e os tabuleiros utilizados para colocar o resíduo foram previamente pesados a frio, e depois, o conjunto folha, resíduo de amêndoa e tabuleiro foi pesado antes de ser introduzido no desidratador. Ao longo do tempo foram sendo efetuadas pesagens a frio até se atingir o peso correspondente a aproximadamente 10 % (m/m) de humidade (calculado por estimativa). O resíduo resultante da secagem foi posteriormente moído com uma picadora de cozinha 1-2-3 (Moulinex, modelo 320, França) até obter um pó tipo “farinha”.

2.1.3. Caracterização química

Efetou-se a caracterização química à bebida de amêndoa, aos coprodutos resíduo e soro de amêndoa assim como ao resíduo hidrolisado enzimaticamente.

2.1.3.1. Hidrólise do resíduo de amêndoa

Com o objetivo de aumentar o potencial prebiótico do resíduo de amêndoa procedeu-se à hidrólise enzimática do mesmo com recurso ao complexo multi-enzima Viscozyme® L (Sigma-Aldrich, USA). Resumidamente, colocaram-se 40 g de resíduo de amêndoa em 2 L de água destilada (1 g/50 mL) e com uma vareta de vidro homogeneizou-se a mistura e ajustou-se o valor de pH para 4,5. De seguida, adicionaram-se 100 mg de Viscozyme® L por g de amostra de resíduo de amêndoa e colocou-se a mistura em banho de água termostaticado (12B, Julabo, Alemanha) a 50 °C durante 24 h. Após este período, a mistura foi filtrada com filtro de papel, foi congelada a -80 °C e por fim liofilizada ao longo de 5 dias no liofilizador (Loc 1-m, Christ, Alemanha).

2.1.3.2. Acidez titulável

Para a determinação da acidez titulável da bebida, resíduo e soro de amêndoa transferiram-se, em duplicado, 5 g de cada amostra para matrizes de 100 mL, e acrescentou-se 50 mL de água morna (40 °C) isenta de gás carbónico. Com a ajuda de uma vareta de vidro agitou-se a mistura até dissolução possível. Transferiu-se em seguida, a mistura para um balão volumétrico de 100 mL e perfez-se o volume com água. Em seguida, transferiu-se 50 mL da mistura para um gobelé e adicionaram-se 10 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína a 1 % (m/v), e titulou-se com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 N até se obter uma

leve coloração rosácea persistente por aproximadamente 30 s. A diferença entre os volumes inicial e final foi registrada e a percentagem de ácido láctico foi calculada a partir da seguinte equação (Equação 2.2):

$$\text{Ácido láctico (\%)} = \frac{V \times f \times 0,9}{m} \quad 2.2$$

sendo f o fator de correção da solução de NaOH, 0,9 o fator de conversão do ácido láctico e m a massa da amostra em gramas.

2.1.3.3. Quantificação de açúcares totais

A determinação de açúcares totais foi efetuada pelo método fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) recorrendo à curva de calibração (Apêndice 7.1) previamente estabelecida usando diferentes volumes de uma solução padrão de glucose (correspondente a concentrações entre 0,05-0,30 mg/mL), e os resultados foram expressos como concentração de açúcares totais (mg de açúcares totais/g). Foram pesados entre 10 a 20 mg de amostra para 1 mL de dH₂O em eppendorfs de 1,5 mL. A mistura foi homogeneizada no *vortex* e subsequentemente foram feitas as diluições necessárias para que os valores se encontrassem dentro da curva de calibração. De seguida, pipetaram-se 80 µL de amostra, 150 µL de solução aquosa de fenol (5% (m/v)) e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado para tubos de ensaio. Os tubos foram colocados 10 min em banho de água termostaticado (12B, Julabo, Alemanha) a 100°C, procedendo-se depois à leitura das absorvâncias a 490 nm utilizando o espectrofotómetro UV-Vis (UVmini 1240, Shimadzu, EUA). Todas as medições foram efetuadas em triplicado.

2.1.3.4. Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais nas diferentes amostras foi efetuada utilizando o *kit* Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific, EUA) em microplaca de 96 poços (96 Well-F, Sarstedt, Alemanha), recorrendo à curva de calibração (Apêndice 7.2) estabelecida usando diferentes concentrações de solução padrão de albumina (correspondente a concentrações entre 0,0 e 4,0 mg/mL), e os resultados foram expressos como concentração de proteína total (mg de proteína total/g). Foram pesados aproximadamente 10 mg de cada amostra para *eppendorfs* de 1,5 mL e foi adicionado 1 mL de dH₂O. Depois de se homogeneizar a mistura num *vortex*, efetuaram-se as diluições necessárias para que os valores se encontrassem dentro da curva de calibração. A mistura de reagentes foi preparada numa proporção de 50 partes de Reagente A para 1 parte de Reagente B do *kit*. De seguida, adicionaram-se 200 µL da mistura dos reagentes a 25 µL de amostra e colocou-se numa estufa a 37 °C durante 30 min. Ao fim deste tempo, procedeu-se à leitura das absorvâncias a 562 nm utilizando um leitor de

microplacas com fluorescência (Multiskan GO v1.00.40, Thermo Scientific, EUA) e usando o programa SkanIt Software, versão 4.1.0.43. Todas as medições foram efetuadas em triplicado e foi efetuado um branco com água.

2.1.3.5. Quantificação de ácidos gordos esterificados e não esterificados

Os ácidos gordos esterificados e não esterificados foram quantificados diretamente pelo protocolo FAME de acordo com Pimentel *et al.* (2015). Para a realização deste procedimento foram pesados 500 mg de cada amostra em tubos de ensaio. Para a primeira reação (Reação da fase K, ácidos gordos esterificados) pipetaram-se 200 µL de TG C13, 100 µL de FFA C11, 100 µL de metil acetato, 3,7 mL de hexano e 2,26 mL de metanol. De seguida, adicionaram-se 240 µL de metóxido de sódio e homogeneizou-se a mistura num *vortex* por 10s. Depois os tubos foram colocados a 40°C durante 10 min. Depois de arrefecerem, adicionaram-se aos tubos de ensaio 500 µL de H₂O para se interromper a reação e homogeneizou-se novamente a mistura por 10s. Subsequentemente, os tubos foram centrifugados a 1250 rpm durante 5 min. Por último, retirou-se o sobrenadante e transferiu-se para tubos de falcon contendo 200 µL de FAME C23, constituindo a fase K. Desses tubos retirou-se 1 mL para *vials* para posterior análise por cromatografia gasosa (GC System 6890, HP, EUA). Para a segunda reação (Reação da fase H, ácidos gordos não esterificados), o conteúdo dos tubos de ensaio foi ressuspenso em 2 mL de hexano e homogeneizou-se a mistura durante 15s. Depois, os tubos foram centrifugados a 1250 g durante 5 min. Retirou-se o sobrenadante para os tubos de falcon e adicionaram-se 100 µL de FAME C23, 1,25 mL de dimetilformanido (DFM), 1,25 mL de ácido sulfúrico (3 M) e colocaram-se os tubos a 60 °C durante 30 minutos. Depois de arrefecidos adicionaram-se 750 µL de hexano e homogeneizou-se a mistura durante 1 min. Por fim, os tubos foram centrifugados a 1250 rpm durante 10 min e retirou-se o sobrenadante para *vials* para serem analisadas por cromatografia gasosa.

As condições de análise foram as seguintes: injetor (*split* 25:1, volume de injeção de 1 µL); temperaturas do injetor e do detetor de 250 e 275 °C, respetivamente; taxa de fluxo de 1 mL/min. A temperatura inicial do forno é de 60 °C, aumentando depois para a temperatura final de 225 °C. Todas as análises foram efetuadas em duplicado. Os resultados foram determinados através da integração dos cromatogramas e expressos como concentração de ácidos gordos (AG) (µg de AG/mg). Os limites de deteção (LD) e de quantificação (LQ) são, respetivamente, 0,79 ng AG/mL e 2,64 ng AG/mL.

2.1.4. Caracterização biológica

2.1.4.1. Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante foi determinada utilizando os seguintes métodos: captura do radical ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) segundo Gião *et al.* (2007) e captura do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) segundo Bondet *et al.* (1997).

Preparação da amostra. Para ambos os procedimentos foram pesados aproximadamente 100 mg de cada amostra para tubos de 15 mL e, de seguida, foram adicionados 5 mL de água desionizada a cada um dos tubos. Esses tubos foram, então, centrifugados a 8000 rpm durante 10 min a 4 °C (Universal 32R, Hettich, Alemanha). O sobrenadante foi utilizado para a execução dos métodos.

2.1.4.1.1. ABTS^{•+}

Preparação da solução de ABTS^{•+}. No dia anterior à execução do método, pesou-se para um tubo 0,03891 g de ABTS para 10 mL de água desionizada e noutro tubo 0,0066 g de persulfato de potássio para 10 mL de água. A solução de ABTS^{•+} foi preparada a partir da mistura na proporção de 1:1 (v/v) da solução de ABTS a 7 mmol/L com a solução de persulfato de potássio a 2,45 mmol/L ao abrigo da luz e foram deixadas a reagir pelo menos 16 h em agitação.

Preparação da solução de ABTS^{•+} diluída. No dia da execução do método, foi preparada a solução de ABTS^{•+} diluída num frasco de shot, diluindo 1 mL da solução concentrada de ABTS^{•+} em 40 mL de água usando um filtro de 0.22 µm, de forma a que a sua absorvância fosse 0,700±0,0200, a 734 nm. De seguida, a solução ficou a repousar por 10 min e, no fim, verificou-se novamente a absorvância.

Análises. Num espectrofotómetro UV-Vis (UVmini 1240, Shimadzu, EUA), foi efetuado o auto-zero com uma cuvete contendo 1 mL de H₂O. Foram colocados a reagir 2 mL de solução de ABTS^{•+} diluída com 120 µL de amostra em cuvetes de 3 mL e aguardou-se 6 min ao abrigo da luz. Ao fim deste período de tempo, a absorvância foi medida a 734 nm. Foi efetuado um branco com água no início da corrida (Abranco). Foram realizadas três réplicas. Usando o ácido ascórbico como padrão (0 a 60 µg / mL), os resultados foram expressos como concentração equivalente de compostos fenólicos (mg de compostos fenólicos equivalentes/g), enquanto a percentagem de atividade inibidora foi calculada usando a seguinte equação (Equação 2.3):

$$\text{Inibição (\%)} = \left(\frac{\Delta Abs_{\text{controlo}} - \Delta Abs_{\text{amostra}}}{\Delta Abs_{\text{controlo}}} \right) \times 100 \quad 2.3$$

Para a realização da curva de calibração (Apêndice 7.3) foram preparadas várias concentrações de ácido ascórbico a partir de uma solução stock de 1 mg/mL (10 mg de ácido ascórbico/10 mL de água desionizada), procedendo-se às leituras de absorvância conforme o descrito acima.

2.1.4.1.2. DPPH

Preparação da solução de DPPH concentrada. No dia anterior à realização do método, foi preparada uma solução concentrada de DPPH (600 μ M). Para tal, num balão volumétrico de 100 mL foram colocados 24 mg de DPPH em 100 mL de metanol. A solução foi deixada no congelador ao abrigo da luz.

Preparação da solução de DPPH diluída. No dia da execução do método, foram colocados 10 mL de solução concentrada de DPPH num balão volumétrico e fez-se o volume final de 100 mL com metanol para a sua absorvância ser de $0,600 \pm 0,100$.

Análises. Em primeiro lugar, foi feito um auto-zero com 2 mL de metanol no espectrofotómetro UV-Vis (UVmini 1240, Shimadzu, EUA). De seguida, foram colocados a reagir em tubos de ensaio pequenos, 3 mL de solução DPPH (60 μ M) com 100 μ L de amostra e aguardou-se 30 min. Após esse tempo, o conteúdo dos tubos de ensaio foi vertido para cuvetes 3 mL e procedeu-se à leitura da absorvância (Abs amostra) no espectrofotómetro a 515 nm. Foi também efetuado um branco em que a amostra foi substituída por água (Abs branco) e para cada amostra, foi medida a absorvância de 3 mL de DPPH com 100 μ L de metanol (Abs controlo). Três réplicas foram feitas. Usando o TROLOX como padrão (0 a 0,05 mg/mL), os resultados foram expressos como concentração equivalente de compostos fenólicos (mg de compostos fenólicos equivalentes/g), enquanto a percentagem de atividade inibidora foi calculada pela Equação 2.3.

Para a curva de calibração (Apêndice 7.4) foram preparadas várias concentrações de TROLOX (0,005-0,08 mg/mL) a partir de uma solução stock de 1 mg/mL em tubos de 15 mL (Solução-mãe: 1 mg/mL:10mg de trolox em10 mL de metanol), e procederam-se às leituras de absorvância conforme o descrito acima.

2.1.4.2. Atividade antidiabética

A atividade antidiabética foi determinada pela inibição da enzima α -glucosidase em microplacas de 96 poços (96 Well-F, Sarstedt, Alemanha) conforme o método descrito por Kwon *et al.* (2008). Para tal, colocaram-se aproximadamente 10 mg de amostra em 1 mL de H₂SO₄ (13 mM). As amostras foram centrifugadas a 8000 rpm durante 10 min a 4°C (Universal 32R, Hettich, Alemanha). Em seguida, adicionaram-se 50 μ L de sobrenadante a

100 µL de solução tampão fosfato a 0.1 M (pH 6.9) contendo solução de enzima α -glucosidase (1.0 U/mL). De seguida foi adicionado em cada poço da microplaca 50 µL da solução p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (5 mM) em tampão fosfato a 0.1 M (pH 6.9). A mistura foi depois incubada a 25 °C durante 5 min, a sua absorvância (Abs amostra) foi registada a 405 nm por um leitor de microplacas com fluorescência (Multiskan GO v1.00.40, Thermo Scientific, EUA), usando o programa SkanIt Software, versão 4.1.0.43, e comparada com o controlo negativo (Abs controlo) que em vez do extrato levou 50 µL da solução tampão. Foram efetuadas três réplicas por amostra. Para o controlo positivo foi utilizada a acarbose (A8980, Sigma-Aldrich, EUA) numa concentração equivalente ao da amostra (10 mg/mL de solução tampão). A atividade inibidora da enzima α -glucosidase foi expressa em percentagem de inibição pela Equação 2.3.

2.1.4.3. Atividade prebiótica

2.1.4.3.1. Avaliação através da determinação da densidade ótica em microplaca

Com o objetivo de se realizar uma avaliação prévia do potencial prebiótico da bebida de amêndoa, dos coprodutos resíduo e soro de amêndoa e do resíduo hidrolisado, procedeu-se à determinação da densidade ótica em microplaca das amostras inoculadas com *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 ((nu-trish® BB-12®), CHR Hansen). As fontes de hidratos de carbono estudadas foram a glucose a 2 % (m/v), FOS a 2 % (m/v), 2 e 4 % (m/v) resíduo de amêndoa desidratado moído (10 % humidade m/m), 2 % (m/v) de resíduo de amêndoa hidrolisado com Viscozyme, bebida de amêndoa e soro de amêndoa. O resíduo de amêndoa desidratado (2 e 4 % m/v) e o resíduo hidrolisado (2 % m/v), sendo sólidos, foram suspensos no meio MRS, não sendo possível a sua total dissolução. No caso do soro e da bebida de amêndoa, sendo líquidos constituíram o próprio meio de cultura para a *B. animalis* BB-12.

Tratamento térmico por pasteurização. As diferentes amostras (resíduo desidratado, resíduo hidrolisado, bebida e soro de amêndoa) foram previamente pasteurizados em banho de água termostático (12B, Julabo, Alemanha) a 90 °C durante 10 min. A temperatura foi controlada através de um termómetro.

Preparação dos vários meios de cultura. O meio MRS utilizado para a suspensão dos resíduos foi preparado através da mistura de 0,5 g/L de caseína (BP376-100, Fluka, Bélgica), 10 g/L de extrato de carne (Merck, Alemanha), 4 g/L de extrato de levedura (Biokar, Diagnostics, França), 1,08 g/L de tween 20 (Merck), 2 g/L de fosfato de di-potássio (Merck), 5 g/L de acetato de sódio (Merck), 2 g/L de citrato de amónio (Sigma-Aldrich), 0,2 g/L de

sulfato de magnésio (Merck), 0,05 g/L de sulfato de manganésio (Sigma-Aldrich) e 20 g/L da respetiva fonte de carbono. Baseada nesta composição do meio MRS, foram preparados seis tipos de meio de cultura: (i) MRS sem fonte de carbono (controlo negativo), (ii) MRS com 2 % (m/v) de glucose (controlo positivo), (iii) MRS com 2% (m/v) de frutooligossacarídeo (FOS) (Orafti® P95; Orafti, Belgium) (controlo positivo), (iv) MRS com 2% (m/v) de resíduo desidratado moído, (v) MRS com 4% (m/v) de resíduo desidratado moído e (vi) MRS com 2% (m/v) de resíduo hidrolisado com Viscozyme®L. A concentração de 2% da fonte carbono foi escolhida com base na composição do meio MRS comercial que contém 2% (m/v) de glucose. O FOS foi usado como controlo positivo sendo um prebiótico validado e já comercializado.

Reativação e inoculação dos meios. O inóculo foi preparado a partir da suspensão de cultura liofilizada *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 ((nu-trish® BB-12®), CHR Hansen) em 15 mL de MRS *broth* suplementado com 0,5 g/L de cisteína e 10 g/L de extrato de carne. Após 24h de crescimento em anaerobiose a 37 °C, 1 mL de suspensão foi adicionada (em duplicado) a 15 mL de MRS *broth* suplementado com 0,5 g/L de cisteína (BP376-100, Fluka, Bélgica) e 10 g/L de extrato de carne. Após a inoculação, cada tubo de MRS *broth* foi incubado em anaerobiose a 37°C durante 24h. Os diferentes meios de cultura (MRS), bebida e soro de amêndoa foram depois inoculados com 2% (v/v) da cultura de *B. animalis* BB-12 reativada.

Análise: De cada meio inoculado (MRSs, bebida e soro de amêndoa inoculados), foram transferidos 250 µL em triplicado, para uma microplaca de 96 poços (96 Well-F, Sarstedt, Alemanha). Por se tratar de meios opacos, foi também realizado um branco para cada meio (MRSs com os resíduos pasteurizados e bebida e soro pasteurizados). Cada poço recebeu 50 µL de parafina para garantir as condições de anaerobiose. De seguida, a microplaca contendo todos as amostras foi incubada durante 24h a 37°C e programada para medir a absorvância (Abs) a 660 nm às 0, 6, 10 e 24h (Multiskan GO, v1.00.40, Thermo Scientific, EUA) usando o programa SkanIt Software, versão 4.1.0.43. Os resultados obtidos serviram para avaliar quais as amostras com maior potencial prebiótico para posteriormente se proceder à avaliação em macroplaca do número de células viáveis de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12.

2.1.4.3.2. Avaliação através da determinação do número de células viáveis em macroplaca

Reativação do inóculo. O inóculo de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 foi preparado segundo o descrito na secção “Reativação do inóculo” do tópico 2.1.4.3.1.

. Cerca de 250 mL de bebida de amêndoa, 250 mL de soro e os tubos de ensaio contendo o meio com os resíduos foram pasteurizados a 90 °C durante 10 min conforme descrito anteriormente.

Inoculação das amostras em estudo. Os inóculos foram diluídos em tampão fosfato (pH 7,2) estéril de modo a obtermos uma absorvância correspondente a uma carga microbiana inicial entre 10^5 e 10^6 UFC/mL (determinado por teste prévio realizado em macroplaca). A absorvância do inóculo foi lida a 600 nm no espectrofotómetro UV-Vis (UVmini 1240, Shimadzu, EUA). As amostras em estudo e os respetivos controlos foram distribuídos por tubos de ensaio estéreis e inoculados, em duplicado, com *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 a 2% (v/v), um tubo de 15 mL para cada ponto de amostragem (0, 6, 10, 24 e 48 h) conforme o descrito na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Meios de cultura e respetivos controlos utilizados na avaliação da atividade prebiótica.

Meio	Soro de Amêndoa (mL)	Bebida de Amêndoa (mL)	Resíduo desidratado moído (g)	Resíduo hidrolisado (g)	MRS broth (mL)	Glucose (g)	FOS (g)
1	14,70	---	---	---	---	---	---
2	7,35	7,35	---	---	---	---	---
3	---	14,70	---	---	---	---	---
4	---	---	0,3 (2% m/v)	---	14,70	---	---
5	---	---	0,6 (4% m/v)	---	14,70	---	---
6	---	---	---	0,3 (2% m/v)	14,70	---	---
7 Controlo - glucose	---	---	---	---	14,70	0,3 (2% m/v)	---
8 Controlo - FOS	---	---	---	---	14,70	---	0,3 (2% m/v)
9 Controlo negativo*	---	---	---	---	14,70	---	---

*Sem adição de fonte de carbono.

Para cada amostra e respetivos controlos foram preparados 10 tubos com 15 mL cada, os quais foram incubados a 37 °C na estufa orbital (SI-100C, Wigger Hauser, EUA) sob agitação a 120 rpm durante 48 h. Em cada ponto de amostragem (0, 6, 10, 24 e 48 h) foram retirados dois tubos (duplicados) para análise microbiológica.

Análise microbiológica. Em cada ponto de amostragem foi determinado o número de células viáveis de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 assim como avaliada a presença de eventuais contaminações. Para tal 1 mL de cada amostra e respetivos controlos foi retirado e incorporado em 9 mL de água peptonada estéril e, de seguida, foram feitas diluições sequenciais (da -2 à -7) em água estéril com peptona (0,1 %, m/v) e NaCl (0,85 %, m/v). De seguida, procedeu-se ao plaqueamento em duplicado recorrendo ao método da gota (20 µL)

em MRS agar com cisteína (0,05% m/v) e 10 g/L de extrato de carne para o crescimento de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12e em Plate Count Agar (PCA) para a detecção de eventuais contaminações. As placas de MRS agar foram postas a incubar em anaerobiose a 37 °C durante 48 h e as placas de PCA foram postas a incubar em aerobiose a 25 °C durante 3-5 dias. No final, procedeu-se à contagem em duplicado do número de células viáveis expressas em Log (UFC/mL) assim como à leitura em duplicado dos valores de pH em todos os pontos de amostragem com recurso a um potenciómetro (Micro pH 2002, Crison, Espanha).

2.2. Desenvolvimento e caracterização de novos produtos funcionais

Com o intuito de avaliar o potencial uso da bebida de amêndoa e dos coprodutos do processamento de amêndoa como ingredientes na formulação de novos produtos alimentares procedeu-se ao desenvolvimento e teste de dois alimentos: bebida fermentada e creme para barrar.

2.2.1. Produção de bebidas fermentadas

Foram efetuadas formulações à base de soro (100 %) e de soro em mistura com bebida de amêndoa numa proporção de 1:1. Estas, foram fermentadas com mistura de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 e de *Streptococcus thermophilus*. A preparação das bebidas e a sua caracterização estão descritas a seguir.

Reativação do inóculo. Os inóculos foram preparados a partir da cultura probiótica liofilizada de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 e da cultura de *Streptococcus thermophilus* (YoFlex® YF-L01 DA, CHR Hansen) específica para matrizes vegetais. O inóculo de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 foi preparado segundo o descrito na secção “Reativação do inóculo” do tópico 2.1.4.3.1.

O inóculo de *S. thermophilus* foi preparado adicionando 0,05 mL da cultura de *S. thermophilus* em 50 mL de meio líquido *S. thermophilus* isolation agar (STIA) (ver Anexo 6.1), que foi colocado a incubar em aerobiose a 37 °C durante 5 h.

Pasteurização. Cerca de 650 mL de bebida de amêndoa e 1300 mL de soro foram pasteurizados em banho de água termostaticado (12B, Julabo, Alemanha) a 90°C durante 10 min.

Inoculação, Fermentação e Armazenamento. Os inóculos foram diluídos em tampão fosfato (pH 7,2) estéril de modo a obter uma absorvância a 600 nm (UVmini 1240, Shimadzu, EUA) correspondente a uma carga microbiana inicial entre 10⁵ e 10⁶ UFC/mL (determinado por teste prévio realizado em macroplaca). As duas bebidas à base de soro fermentada (BSF) ou não fermentada (BSNF) ou de soro com bebida de amêndoa fermentada (BMF) ou não

fermentada (BMNF) foram preparadas, em duplicado, e inoculadas de acordo com as seguintes proporções:

- Bebida de soro de amêndoa fermentada (BSF): 96 %(v/v) soro + 2 %(v/v) *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 + 2 %(v/v) *S. thermophilus*;
- Bebida de mistura fermentada (BMF): 48 %(v/v) soro + 48 %(v/v) bebida de amêndoa + 2 %(v/v) *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 + 2 % (v/v) *S. thermophilus*;
- Bebida de soro de amêndoa não fermentada (BSNF): 100 %(v/v) soro;
- Bebida de mistura não fermentada (BMNF): 50 %(v/v) soro + 50 %(v/v) bebida de amêndoa.

Após inoculação, as diferentes bebidas foram incubadas a 37 °C na estufa orbital (SI-100C, Wigggen Hauser, EUA) sob agitação a 120 rpm até se atingir o valor de pH de 4,5 controlado através de um potenciômetro (Micro pH 2002, Crison, Espanha). Após fermentação as bebidas foram armazenadas no frigorífico entre 4-5 °C por um período máximo de 21 dias. O valor de pH foi medido aos 7, 14 e 21 dias de armazenamento utilizando um potenciômetro (Micro pH 2002, Crison, Espanha).

Caracterização microbiológica e análise de pH. As análises microbiológicas foram realizadas antes e após da fermentação (0 d) e após 7, 14 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração. Após processamento térmico e em todos os pontos de amostragem foi também avaliada a presença de eventuais contaminantes nas bebidas. Em cada um dos pontos de amostragem, foi adicionado 1 mL de amostra em 9 mL de água peptonada estéril e procedeu-se às diluições (da -2 à -7). De seguida, as amostras foram plaqueadas, em duplicado, recorrendo ao método da gota (20 µL) em STI Agar para enumeração de *S. thermophilus*, em MRS agar com cisteína (0,05 % m/v) e extrato de carne (10 g/L) para enumeração de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, e em PCA para a deteção de eventuais contaminantes. As placas de STI Agar foram incubadas em aerobiose a 37 °C durante 48-72 h, as placas de MRS agar foram incubadas em anaerobiose a 37 °C durante 48 h e as placas de PCA foram incubadas em aerobiose a 25 °C durante 3-5 dias. No final, procedeu-se à contagem em duplicado do número de células viáveis expressas em Log (UFC/mL).

Caracterização química e biológica. Procedeu-se caracterização química e biológica das bebidas fermentadas conforme as metodologias descritas nos pontos 2.1.3 e 2.1.4, respetivamente, tendo-se avaliado os teores de acidez titulável, açúcares totais, proteína total assim como a atividade antioxidante e antidiabética aos 0 e 21 de armazenamento sobre refrigeração.

2.2.2. Produção de cremes para barrar

Numa última etapa procedeu-se à formulação de cremes para barrar à base de resíduo de amêndoa. Efetuaram-se vários testes preliminares que foram avaliados por um painel de provadores (dados não mostrados) e que levou ao estabelecimento da formulação final base para cremes para barrar composta por uma mistura de resíduo de amêndoa húmido, água fava, sumo de limão, óleo de coco e sal conforme descrito na Figura 2.2.

Os vários ingredientes foram pesados e misturados numa Bimby (Vorwerk, Portugal) durante 3 minutos. De modo a avaliar a estabilidade e o impacto de processamento térmico, um dos cremes de barrar não foi pasteurizado (CNP), e os outros dois foram pasteurizados a 90 °C durante 10 min na Bimby (CP). Um dos cremes pasteurizado foi de seguida inoculado com o probiótico *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 designado por creme de barrar pasteurizado probiótico (CPP).

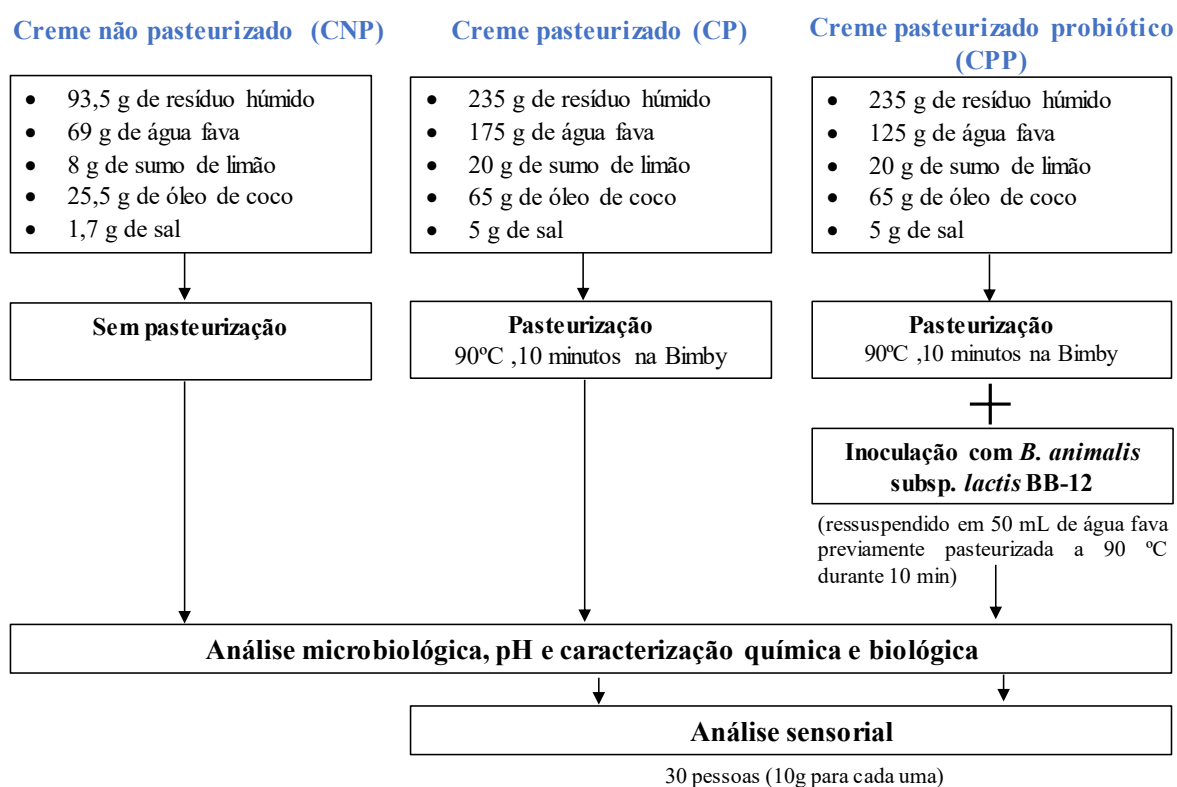


Figura 2.2. Representação esquemática do procedimento experimental da produção de três diferentes cremes para barrar (CNP, CP e CPP).

Reativação do inóculo. O inóculo de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 foi preparado segundo o descrito na secção “Reativação do inóculo” do tópico 2.1.4.3.1. Foram preparados 5 tubos com inóculo que foram centrifugados 3x em solução salina estéril (0,85% (m/v) de NaCl), eliminando-se o sobrenadante em cada lavagem, sendo os inóculos depois ressuspendidos em 50 mL de água fava estéril, que foram usados para inocular o CPP.

Caracterização microbiológica e análise de pH. Em cada ponto de amostragem foi determinado o número de células viáveis de bolores e leveduras, enterobactérias, bactérias lácticas, mesófilos e psicrófilos totais dos três cremes para barrar e de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 do CPP. Sob condições assépticas, 4 g de cada amostra (CNP, CP e CPB) foram pesadas, transferidas para um matraz e diluídas e seguidamente homogeneizadas em 40 mL de água peptonada estéril contendo peptona (0,1 %, m/v) e NaCl (0,85 %, m/v) durante 1 min num aparelho Stomacher® (Modelo 400 Circulator). Foram realizadas de seguida, diluições decimais sequenciais (da -2 à -7) por diluição de 1 mL de cada amostra em 9 mL de água peptonada com NaCl. De seguida, procedeu-se ao plaqueamento em duplicado recorrendo ao método da gota (20 µL) em PDA para o crescimento de bolores e leveduras, em MRS agar para bactérias lácticas, em PCA para mesófilos e psicrófilos totais e em MRS agar com cisteína (0,05% m/v) e 10 g/L de extrato de carne para *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12. As placas com PDA foram incubadas 2-7 dias a 25 °C, as placas com MRS agar com e sem cisteína foram incubadas em anaerobiose a 37 °C durante 48 h e as placas com PCA foram inoculadas em aerobiose a 25 °C durante 3-5 dias. O meio VRBGA foi inoculado por incorporação (100 µL) para o crescimento de enterobactérias e incubado em aerobiose a 37 °C durante 24-48 h. No final, procedeu-se à contagem em duplicado do número de células viáveis expressas em Log (UFC/g) assim como à leitura em duplicado dos valores de pH em todos os pontos de amostragem com recurso a um potenciómetro (Micro pH 2002, Crison, Espanha).

Caraterização química e biológica. Nos vários cremes foram avaliados os teores de acidez titulável após 0, 7 e 14 dias de armazenamento sobre refrigeração. No que respeita à determinação do teor de açúcares totais, proteína total, ácidos gordos totais e da atividade antioxidante e antidiabética, só foi possível determinar após produção (0 d).

Análise sensorial. Com a finalidade de avaliar as características sensoriais dos cremes para barrar produzidos foi realizada uma prova de análise sensorial (Figura 2.3). Apenas os cremes pasteurizados foram sujeitos à prova (CP e CPP), os quais foram avaliados após 2 dias de armazenamento sob refrigeração. O painel foi constituído por 30 elementos (8 homens e 22 mulheres) de faixa etária compreendida entre os 21 e os 52 anos, sendo eles colaboradores da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa. Foram realizados testes de aceitação de atributos, onde foi utilizada uma escala nominal de nove categorias (Desgosto extremamente até Gosto extremamente) para avaliar os atributos aspeto, odor, sabor, cremosidade, consistência, adstringência e apreciação global. O respetivo questionário de análise sensorial encontra-se no Apêndice 7.5.

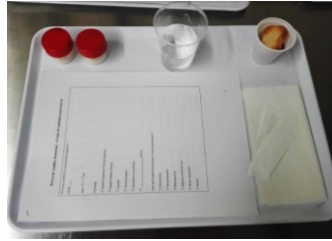


Figura 2.3. Exemplo de disposição de material para a prova de análise sensorial relativa aos cremes para barrar.

2.3. Análise Estatística

Os resultados das várias análises microbiológicas, químicas e de atividades biológicas são apresentados sob a forma de média e respetivo desvio padrão de réplicas. Foi realizada a análise de variância com um fator (*one-way ANOVA*), com efeitos fixos, em associação com o teste Tukey com um intervalo de confiança a 95 % entre as diferenças em grupos de amostras e de lotes para os diferentes tipos ensaios. Todos os testes foram realizados com um nível de significância de 5 %, e utilizando o software SPSS (v 21.0, EUA).

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização microbiológica e pH

Na Tabela 3.1 encontram-se registados os números de células viáveis (Log UFC/mL ou g) para os diferentes grupos de microrganismos avaliados nas amostras de bebida, resíduo e soro de amêndoa de seis diferentes lotes recebidos entre outubro de 2017 e julho de 2018.

No que diz respeito à bebida de amêndoa, apenas dois dos lotes (i.e. lotes 1 e 6) avaliados ao longo do tempo de vigência do estudo, revelaram uma aparente ausência dos microrganismos contaminantes analisados (não foram detetáveis UFC acima do limite de deteção). O lote 6 do soro de amêndoa também revelou um padrão de ausência de contaminação equivalente.

É possível observar, que independentemente do período em que foram efetuadas as amostragens, não foi detetada contaminação pela presença de *S. aureus* e de enterococos totais nos três tipos de amostras: bebida de amêndoa, resíduo de amêndoa e soro de amêndoa, o que representa um resultado satisfatório, já que estes dois grupos bacterianos são de grande relevância ao nível da segurança alimentar. *Staphylococcus aureus* essencialmente por ser produtor de enterotoxinas mediante as condições da matriz e enterococos, não só por serem um indicador de contaminação fecal, mas também por poderem degradar precocemente as macromoléculas da matriz. Por outro lado, o número de células viáveis de enterobactérias encontrada nas diferentes amostras variou amplamente de valores igualmente abaixo do limite

de detecção (lotes 1, 2 bebida e soro, e 6) até valores superiores a 10^5 UFC/mL. Esta presença considerável de enterobactérias na maioria dos lotes (lotes 2, 3, 4 e 5) é um indicador de contaminação fecal, que pode advir da manipulação ao longo do processo de fabrico, sendo este resultado considerado não satisfatório. Ainda no que diz respeito a este grupo microbiológico, no lote 4, o resíduo e o soro de amêndoa não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$).

Nos restantes lotes (lotes 2, 3, 4 e 5) a bebida de amêndoa apresentou concentrações consideráveis sobretudo de bolores e leveduras e de psicrófilos totais, que variaram entre 10^6 e 10^7 UFC/mL para ambos os grupos microbianos. Os bolores e leveduras também predominaram no resíduo da amêndoa tendo sido registados números de unidades formadoras de colónias superiores a 10^8 UFC/mL com exceção do lote 4 que apresentou números acima de 10^6 UFC/mL. Os psicrófilos totais registaram concentrações cerca de um ciclo log inferior nas amostras do resíduo e do soro de amêndoa analisadas.

As bactérias do ácido láctico não fizeram parte da microbiota predominante; estas só surgiram nos lotes 4 e 5 entre todas as amostras analisadas, correspondentes ao mês de abril. No lote 4, o número de bactérias lácticas mostrou-se significativamente diferente entre a bebida, o resíduo e o soro, descendo cerca de um ciclo log entre cada amostra ($p < 0,05$). No geral, este grupo microbiano não acarreta riscos para a saúde, não sendo por isso motivo de alarme. Adicionalmente, este grupo microbiano pode ter um papel importante em processos fermentativos na produção de ácidos orgânicos e outros metabolitos que no seu conjunto contribuem para a qualidade organolética do produto final.

Pela análise estatística dos resultados, é visível uma certa heterogeneidade na carga microbiana global entre lotes. Estas diferenças podem advir de alguma variabilidade no processo de fabrico ou da matéria-prima. A presença de microrganismos contaminantes na bebida e nos coprodutos da amêndoa analisadas, pode representar uma deterioração da qualidade do produto bem como um eventual perigo para a saúde humana, não só no que toca ao consumo da bebida propriamente dita, como também, no que diz respeito à incorporação desta e dos restantes coprodutos no desenvolvimento de novos alimentos. Assim sendo, é recomendável a sua sujeição a um tratamento térmico adequado, como a pasteurização, para a remoção de eventuais microrganismos contaminantes, garantindo também a conservação das suas propriedades nutricionais.

Adicionalmente foi realizada uma análise microbiológica à amêndoa pertencente ao lote 3 (dados não reportados) para os mesmos grupos microbianos, a qual demonstrou estar livre de carga microbiana contaminante. Deste modo, pelo menos neste lote, as possíveis

contaminações microbianas presentes na bebida e no resíduo de amêndoa não têm origem na amêndoa propriamente dita, mas sim da manipulação posterior.

Tabela 3.1. Número de células viáveis para os diferentes microrganismos em amostras de bebida de amêndoa, resíduo e soro de amêndoa de diferentes lotes.

Grupo microbiano	Lote	Amostras Log (UFC/mL)		
		Bebida	Resíduo	Soro
Bolores e leveduras	1	<2,70 ^a	-	-
	2	7,34±0,01 ^b	8,45 ^a	6,34±0,13 ^a
	3	7,47±0,01 ^c	8,09±0,06 ^b	-
	4	6,93±0,09 ^d	6,83±0,02 ^c	5,94±0,07 ^b
	5	6,98±0,03 ^d	-	-
	6	<2,70 ^a	-	<2,70 ^c
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	<2,70	-	-
	2	<2,70	<2,70	<2,70
	3	<2,70	<2,70	-
	4	<2,70	<2,70	<2,70
	5	<2,70	-	-
	6	<2,70	-	<2,70
Bactérias do ácido láctico	1	<2,70	-	-
	2	<2,70	<2,70	<2,70
	3	<2,70	<2,70	-
	4	6,78±0,13 ^{b*}	5,33±0,17 ^{a*}	4,40±0,09 ^{c*}
	5	5,30±0,05	-	-
	6	<2,70	-	<2,70
Enterobactérias	1	<2,48	-	-
	2	<2,48	4,45±0,15	<2,48
	3	4,81±0,16	3,67±0,11	-
	4	4,70±0,00 ^{b*}	5,56 ^{a*}	5,60±0,12 ^{a*}
	5	5,71±0,05	-	-
	6	<2,48	-	<2,48
Enterococos totais	1	<2,70 ^b	-	-
	2	<2,70 ^b	<2,70 ^a	<2,70 ^c
	3	<2,70 ^b	<2,70 ^a	-
	4	<2,70 ^b	<2,70 ^a	<2,70 ^c
	5	<2,70 ^b	-	-
	6	<2,70 ^b	-	<2,70 ^c
Mesófilos totais	1	<2,70 ^a	-	-
	2	7,28 ^b	8,05±0,21 ^a	7,01±0,01 ^a
	3	7,48 ^c	8,26 ^a	-
	4	6,79±0,05 ^d	7,05±0,04 ^b	6,30±0,01 ^b
	5	7,01±0,08 ^c	-	-
	6	<2,70 ^a	-	<2,70 ^c
Psicrófilos totais	1	<2,70 ^a	-	-
	2	7,98±0,05 ^b	6,11 ^a	6,35±0,07 ^a
	3	7,77±0,02 ^c	6,90±0,04 ^b	-
	4	6,89±0,04 ^d	7,05±0,04 ^c	6,21±0,06 ^b
	5	6,98±0,03 ^c	-	-
	6	<2,70 ^a	-	<2,70 ^c

Nota: Para cada amostra (bebida, resíduo ou soro), valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativas entre lotes (na mesma coluna) e para cada grupo microbiano (na mesma linha) ($p>0,05$)

Os valores de pH para as diferentes amostras de bebida, resíduo e soro de amêndoa pertencentes aos mesmos lotes (1 a 6), encontram-se registados na Tabela 3.2. Todas as amostras de bebida, resíduo e soro de amêndoa apresentaram um pH ligeiramente ácido (5.2 a 6.6). De entre as amostras analisadas, o valor de pH foi sempre superior na bebida de amêndoa em todos os lotes, excetuando o lote 4, em que se observou uma maior acidificação, sendo o valor de pH inferior a 6 ao contrário do que aconteceu nos restantes lotes (valores de pH oscilaram entre 6,28 e 6,63). Por oposição, o resíduo de amêndoa do mesmo lote 4 registou o pH mais alto ($\text{pH} > 6$), o que indica que poderá ter ocorrido alguma oscilação no processo de produção originando perfis diferentes de distribuição da acidez. O soro do lote 2 registou um valor de pH cerca de uma unidade inferior ao registado pelos lotes 4 e 6; uma observação menos esperada tendo em conta a não deteção de bactérias do ácido láctico neste lote em particular. Esta heterogeneidade entre lotes pode estar relacionada com a carga microbiana presente, com alguma oscilação durante o processo de produção, ou com diferenças nas características da matéria-prima.

Tabela 3.2. Valores de pH em amostras de bebida, resíduo e soro de amêndoa identificadas de diferentes lotes.

Lote	Amostras		
	Bebida	Resíduo	Soro
1	6,44±0,02 ^a	-	-
2	6,28±0,01 ^b	5,82±0,02 ^a	5,17±0,03 ^a
3	6,28±0,01 ^b	5,82±0,02 ^a	-
4	5,78±0,00 ^c	6,16±0,00 ^b	6,16±0,01 ^b
5	6,48±0,08 ^a	-	-
6	6,63±0,02 ^d	-	6,20±0,01 ^c

Nota: Para cada amostra (bebida, resíduo e soro) valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p > 0,05$)

3.2. Peso seco e ensaios de desidratação

Com o objetivo de determinar o teor de humidade do resíduo de amêndoa antes e após a desidratação (até peso constante) e subsequente moagem, procedeu-se ao ensaio de peso seco. Os resultados obtidos encontram-se registados na Tabela 3.3. O resíduo húmido continha um teor elevado de água registando em média $72,3 \pm 0,7$ % (m/m) de teor de humidade e quando desidratado a 52 °C até peso constante, verificou-se que o seu teor de humidade desceu para um valor cerca de 15 vezes inferior.

Tabela 3.3. Teor de peso seco e de humidade em amostras de resíduo de amêndoa húmido, desidratado e desidratado moído.

	Resíduo húmido	Resíduo desidratado	Resíduo desidratado moído
Peso seco (% m/m)	27,7±0,7	95,2±0,0	95,7±0,0
Humidade (% m/m)	72,3±0,7	4,8±0,0	4,3±0,0

O objetivo de desidratar este coproduto da amêndoa teve como finalidade o seu potencial reaproveitamento para a produção de um pó tipo “farinha” de amêndoa, que posteriormente pudesse ser usada na indústria alimentar para diferentes aplicações, incluindo os setores de panificação e pastelaria (pão, bolachas, bolos, queques, panquecas, etc.) (The uniplanet, 2017; The rising spoon, 2013; Trading waste for abundance, 2015). Além de ser uma potencial alternativa vegan, também é isenta de glúten, pelo que poderia compor uma boa alternativa para o desenvolvimento de alimentos destinados a doentes celíacos (Granato e Ellendersen, 2009). Por outro lado, este excedente ganharia um novo propósito, tornando-se sustentável, pois poderia ser reaproveitado por empresas produtoras de bebida de amêndoa para fins comerciais com valor acrescentado.

Tendo por base este interesse acrescido, foi feito um levantamento de dados bibliográficos/regulamentados no sentido de determinar qual o teor de humidade mais indicado para uma “farinha” de amêndoa. Segundo a Portaria 254/2003 referente às farinhas de trigo, centeio e milho publicada em Diário da República a 19 de Março de 2003, o teor máximo de humidade para estas farinhas é de 14,5 % (m/m). Adicionalmente, de acordo com os dados da tabela de composição de alimentos do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, 2018) os teores de humidade listados para diversas farinhas disponíveis no mercado variam entre os 10,7 e os 13,4 % (m/m), exceto no caso da farinha de alfarroba, que contém 3,2 % (m/m) de humidade. Com base nestes dados considerou-se aceitável estabelecer como teor máximo 10 % (m/m) de humidade para uma “farinha” produzida a partir deste resíduo de amêndoa. Assim, realizaram-se diversos ensaios de desidratação a uma temperatura de 52 °C (temperatura mais próxima dos 50 °C permitida pelo desidratador utilizado) com vista a estimar o tempo necessário para desidratar este resíduo até um teor de humidade de 10 % (m/m). Temperaturas entre 50 e 60 °C constituem temperaturas ótimas de desidratação, já que garantem uma maior preservação das qualidades do produto original, quer em termos nutricionais, quer em termos sensoriais (Correia *et al.*, 2008). O estudo de Correia *et al.* (2008) sobre a desidratação de castanha para produção de “farinha” aponta a temperatura de 60 °C como a que providencia menor redução no teor de amido, enquanto que temperaturas entre 50 e 60 °C correspondem a temperaturas ótimas enzimáticas. Para além disso, temperaturas neste intervalo consomem menos energia, o que se reflete numa poupança monetária. Assim, a uma temperatura de 52 °C, o tempo de desidratação até 10 % (m/m) de humidade (calculado por estimativa relativamente ao peso seco) de uma massa inicial de resíduo de amêndoa de 153,82 g e de 81,10 g foi de aproximadamente 7 h e 30 min e 5h,

respetivamente. Após a desidratação do resíduo de amêndoa foi possível notar um odor característico a amêndoa torrada.

O odor característico percebido após a desidratação pode dever-se a compostos voláteis presentes na amêndoa. Nomeadamente, 58 compostos voláteis foram identificados em amêndoas cruas e torradas por outros investigadores: estes incluem 19 compostos aldeídos e cetonas, 7 pirazinas, 22 álcoois e 10 compostos adicionais (Xiao *et al.*, 2014). Um dos principais constituintes das amêndoas torradas foi identificado como 1- (metiltio) -2-propanol, que não foi encontrado em outros frutos secos torrados, incluindo o amendoim, as nozes, a castanha de caju, os pistácios, ou as avelãs (Xiao *et al.*, 2014).

3.3. Caracterização química

No que diz respeito à caracterização química (acidez titulável, açúcar total e proteína total) e caracterização biológica (atividade antioxidante e antidiabética) das três amostras - bebida e coprodutos de amêndoa - optou-se por apresentar a média dos valores obtidos para os 6 lotes dada a reduzida variabilidade observada entre os diferentes lotes.

No que respeita à acidez titulável, que representa o teor de ácidos orgânicos livres presente nos alimentos, registaram-se valores relativamente baixos (Figura 3.1a), que se correlacionam com os valores de pH ligeiramente ácidos listados anteriormente na Tabela 3.2. O resíduo de amêndoa é o coproduto que apresenta a maior acidez titulável enquanto que a bebida e o soro de amêndoa apresentam valores menores de acidez titulável e semelhantes entre si ($p > 0,05$). A acidez titulável da bebida e dos coprodutos de amêndoa pode variar bastante consoante o processo de produção que é utilizado e os ingredientes que podem ou não ser incorporados nas receitas, pelo que resultados diferentes podem ser obtidos entre estudos, com outros derivados da amêndoa. Por exemplo, Kundu *et al.* (2018) reportaram uma acidez titulável de $0,390 \pm 0,003$ % de ácido láctico para a bebida de amêndoa por eles produzida, um valor ligeiramente superior ao obtido neste estudo.

Em termos de teor de açúcares totais presentes na bebida e nos coprodutos de amêndoa analisados (Figura 3.1b), o resíduo de amêndoa foi a amostra com o maior teor de açúcares totais (186 ± 41 mg/g amostra), valor esse que aumenta significativamente quando é hidrolisado com Viscozyme L. A Viscozyme L é um complexo multi-enzimático que contém uma ampla gama de carbohidrases, incluindo arabanase, celulase, beta-glucanase, hemicelulase e xilanase capaz também de decompor substâncias semelhantes à pectina ramificada encontradas nas paredes celulares das plantas (Ebiosis, 2002). Assim, o resíduo de amêndoa hidrolisado apresentou um teor de açúcares totais cerca de 68 % superior ao do

resíduo de amêndoa não hidrolisado ($p>0,05$), uma vez que estes tornam-se mais disponíveis após hidrólise enzimática. O maior teor de açúcares totais registado para o resíduo de amêndoa relativamente aos teores correspondentes da bebida e do soro também pode estar relacionado com o facto de que durante o processo de produção da bebida de amêndoa, grande parte dos hidratos de carbono que constituem a amêndoa fiquem retidos no resíduo, não conseguindo migrar para a bebida. A bebida de amêndoa foi a amostra com o menor teor de açúcares totais ($3,00 \times 10^{-5}$ g/mL) e bastante inferior aos valores registados na literatura de 0,03 g/mL por Singhal *et al.* (2017) e de $4,58 \times 10^{-4}$ g/mL por Vanga e Raghavan (2017). Por isso, constata-se a existência de uma grande heterogeneidade no que diz respeito ao teor de açúcares totais presentes na bebida de amêndoa. Já no que diz respeito ao soro de amêndoa, este registou um teor de açúcares totais cerca de 10 vezes superior ao da bebida de amêndoa ($p<0,05$), o que pode ser explicado pela adição de algum ingrediente contendo hidratos de carbono durante a produção do queijo de amêndoa tipo fresco – este é produzido a partir da bebida de amêndoa.

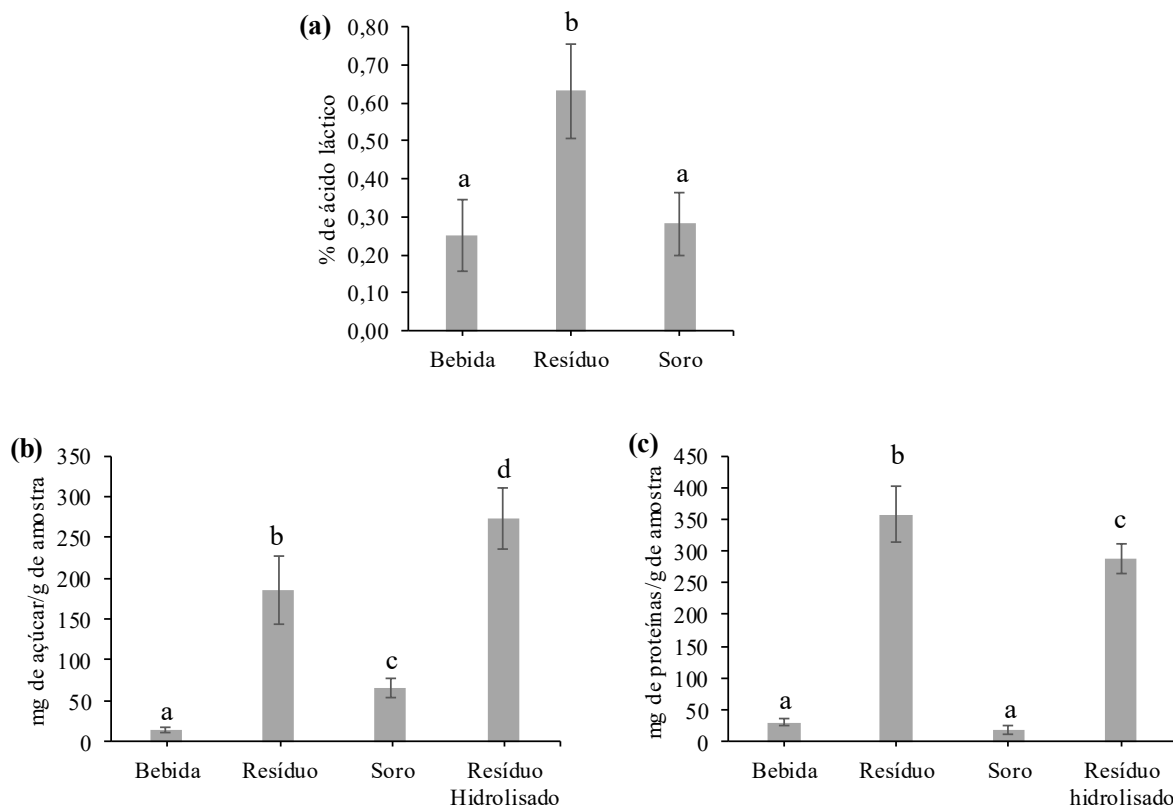


Figura 3.1. Teor de acidez titulável (a), açúcares totais (b) e de proteínas totais (c) em amostras de bebida, resíduo e soro de amêndoa e de resíduo de amêndoa hidrolisado com viscozyme L. Valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p<0,05$).

A proteína é um nutriente de elevada importância para o funcionamento dos organismos. É reconhecida a função da proteína enquanto elemento estrutural das células, mas também no contributo para a ação de enzimas, hormonas e imunoglobulinas. No resíduo de amêndoa

(Figura 3.1.c) registou-se o teor em proteína total mais elevado, seguido por ordem decrescente do resíduo de amêndoa hidrolisado, da bebida de amêndoa e do soro de amêndoa. Não existem diferenças significativas entre o teor de proteína total da bebida e o do soro de amêndoa ($p > 0,05$), os quais apresentaram valores cerca de 7 vezes inferior ao do resíduo de amêndoa ($p < 0,05$). O resíduo de amêndoa hidrolisado registou um teor de proteína total inferior ao do resíduo não hidrolisado, o que era esperado uma vez que o complexo multi-enzima Viscozyme L é constituído apenas por enzimas que hidrolisam hidratos de carbono, não exercendo nenhuma ação hidrolítica sobre as proteínas. Sendo o resíduo uma pasta concentrada de amêndoa triturada resultante da preparação da bebida de amêndoa, é expectável um maior teor de proteína total neste coproduto.

Os lípidos são o principal nutriente energético presentes na amêndoa e estes integram uma gama alargada de ácidos gordos, incluindo ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados, os quais se podem encontrar numa forma livre ou esterificada em triglicéridos. Os teores de ácidos gordos esterificados e livres da bebida de amêndoa, do resíduo e do soro de amêndoa encontram-se registados na Tabela 3.4.

Pelo somatório dos dois grupos de ácidos gordos, o resíduo de amêndoa foi a amostras que apresentou o teor de ácidos gordos totais mais elevado ($529 \pm 27 \mu\text{g}/\text{mg}$) ($p < 0,05$), muito superior ao da bebida ($59 \pm 7 \mu\text{g}/\text{mg}$) e ao do soro ($8 \pm 2 \mu\text{g}/\text{mg}$) de amêndoa (9 e 65x superior, respetivamente), constituindo este último a amostra com menor teor de ácidos gordos totais. A bebida e o resíduo de amêndoa foram mais ricos em ácidos gordos na forma esterificada, enquanto o soro, pelo contrário, apresentou a maior fração dos seus ácidos gordos na forma livre. De entre os ácidos gordos presentes em maior concentração na bebida de amêndoa, destacaram-se os ácidos gordos com 16 ou 18 carbonos, designadamente, o ácido palmítico (C16:0), o ácido palmitoleico (C16:1 *c*9), e os ácidos da série C18 – os ácidos esteárico (C18:0), oleico (C18:1 *c*9), o C18:1 *t*15 e linoleico (C18:2 *c*9*c*12), perfazendo estes seis ácidos gordos mais do que 92 % do teor total de ácidos gordos. No resíduo de amêndoa, para além dos ácidos gordos presentes na bebida de amêndoa, destacam-se ainda o ácido C17:1 *c*16, o ácido araquídico (C:20) e o ácido vacênico (C18:1 *c*11), perfazendo 97 % do teor total de ácidos gordos. O perfil de ácidos gordos totais no soro de amêndoa é semelhante aos perfis das outras matrizes, acrescido do ácido láurico (C12:0) um dos ácidos gordos maioritários nesta matriz que representa cerca de 9 % do teor total de ácidos gordos.

Tabela 3.4. Teor de ácidos gordos esterificados e de ácidos gordos livres em amostras de bebida, resíduo e soro de amêndoa. Para cada amostra (bebida, resíduo e soro) valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p>0,05$); na: não aplicável

	Ácidos gordos esterificados ($\mu\text{g}/\text{mg}$)			Ácidos gordos livres ($\mu\text{g}/\text{mg}$)		
	Bebida	Resíduo	Soro	Bebida	Resíduo	Soro
C4:0	0,07±0,01	0,036±0,005	0,036±0,004	na	na	na
C5:0	na	na	na	0,007±0,001	0,006±0,000	0,014±0,002
C6:0	0,07±0,01	0,040±0,002	0,038±0,007	0,012±0,001	0,012±0,001	0,018±0,003
C7:0	na	na	na	0,013±0,001	0,011±0,000	0,022±0,002
C8:0	0,08±0,02	0,046±0,005	0,035±0,005	0,003±0,000	0,003±0,001	0,02±0,01
C9:0 (DMF)	na	na	na	1,1±0,1 ^a	2,8±0,2 ^b	3,5±0,89 ^b
C10:0	na	0,017±0,009	na	na	na	na
C11:0 (FFA)	na	na	na	0,295±0,006 ^a	0,317±0,003 ^b	0,342±0,002 ^c
C12:0	na	0,10±0,08	0,66±0,04	0,001±0,001	0,008±0,005	0,06±0,06
C13:0	0,56±0,01 ^a	0,609±0,005 ^b	0,646±0,004 ^c	0,012±0,003	0,042±0,001	0,023±0,000
C14:0	0,02±0,01	0,17±0,02	0,1±0,1	0,001±0,000	0,014±0,001	0,02±0,02
C14:1	na	0,019±0,008	na	na	0,002±0,000	na
C15:0	na	0,054±0,003	na	na	0,005±0,000	na
C16:0 <i>isso</i>	na	0,027±0,003	na	na	na	na
C15:1	na	0,027±0,007	na	na	0,002±0,000	na
C12:0 3OH	0,05±0,01	0,033±0,003	0,022±0,001	na	na	na
C16:0	3,6±0,5 ^a	33±2 ^b	0,11±0,06 ^c	0,12±0,04 ^a	2,6±0,2 ^b	0,07±0,02 ^a
C16:1 <i>c7</i>	0,018±0,001	0,13±0,02	na	na	0,011±0,001	na
C16:1 <i>c9</i>	0,32±0,06 ^a	2,9±0,3 ^b	0,010±0,002 ^c	0,009±0,003	0,23±0,03	0,02±0,01
C17:0 <i>isso</i>	0,012±0,003	0,09±0,02	na	na	0,009±0,001	na
C17:0 <i>aiso</i>	na	0,011±0,001	na	na	na	na
C17:0	na	0,27±0,02	na	0,001±0,000	0,022±0,001	na
C17:1 <i>c16</i>	0,051±0,005	0,431±0,009	na	0,001±0,000	0,033±0,002	na
C18:0 <i>isso</i>	0,018±0,003	0,016±0,007	na	na	na	na
C18:0	1,2±0,3 ^a	12±1 ^b	0,04±0,02 ^c	0,04±0,01 ^a	1,0±0,1 ^b	0,021±0,002 ^a
C18:1 <i>t4</i>	0,07±0,03	0,011±0,001	0,005±0,000	na	na	na
C18:1 <i>t6t9</i>	0,04±0,01	0,05±0,01	na	0,002±0,001	0,014±0,001	na
C18:1 <i>t10</i>	0,031±0,003	0,16±0,02	na	0,002±0,001	0,007±0,001	na
C18:1 <i>c9</i>	36±3 ^a	336±15 ^b	0,48±0,09 ^c	1,1±0,3 ^a	26±1 ^b	0,3±0,1 ^c
C18:1 <i>t15</i>	0,66±0,07	0,029±0,007	0,013±0,000	na	na	na
C18:1 <i>c11</i>	0,26±0,06	0,13±0,01	0,017±0,006	0,020±0,006 ^a	0,48±0,02 ^b	0,015±0,009 ^a
C18:1 <i>c12</i>	na	na	na	0,013±0,003	0,010±0,001	0,003±0,000
C18:1 <i>c13</i>	0,024±0,004	0,013±0,001	na	na	0,006±0,001	na
C18:2 <i>t9t12</i>	0,018±0,005	0,11±0,02	na	na	0,018±0,002	na
C18:2 <i>c9t12</i>	na	0,015±0,001	na	na	0,005±0,001	na
C18:2 <i>c9c12</i>	11±2 ^a	97±6 ^b	0,13±0,02 ^c	0,4±0,1 ^a	7,6±0,5 ^b	0,05±0,03 ^c
C18:2 <i>c9c15</i>	0,044±0,004	0,058±0,003	na	na	0,006±0,001	na
C18:3 <i>c6c9c13</i>	na	0,018±0,001	na	na	0,005±0,000	na
C18:3 <i>c9c12c15</i>	0,022±0,003	0,156±0,006	na	0,010±0,001	0,013±0,001	0,002±0,001
C20:0	0,222±0,040 ^a	0,45±0,04 ^b	na	na	0,038±0,004	na
C18:2 <i>c9t11</i>	na	0,047±0,006	na	na	na	na
C20:1 <i>c7</i>	0,013±0,004	0,107±0,008	na	na	0,009±0,001	na
C20:1 <i>c9</i>	0,033±0,006	0,30±0,01	na	na	0,032±0,007	na
C20:1 <i>c11</i>	0,060±0,005	0,07±0,02	na	0,003±0,000	na	na
C21:0	na	0,031±0,005	na	na	na	na
C22:0	0,014±0,002	0,10±0,02	na	na	0,014±0,005	na
EPA 20:5 (<i>n-3</i>)	na	0,15±0,02	na	na	0,07±0,01	na
C21:5 (<i>n-3</i>)	na	0,14±0,02	na	na	0,067±0,008	na
C23:0	1,0±0,2 ^a	0,73±0,03 ^b	0,70±0,05 ^b	0,31±0,03 ^a	0,354±0,008 ^b	0,59±0,05 ^c
C20:2 <i>c13c16</i>	na	0,17±0,03	na	na	0,09±0,02	na
C20:1 (<i>n-iso</i>)	na	0,20±0,03	na	na	na	na
C20:2 (<i>n-iso</i>)	na	na	na	na	0,09±0,02	na
C24:0	0,016±0,003	0,050±0,005	na	na	0,004±0,001	na
C22:6 (DHA) (<i>n-3</i>)	na	0,023±0,002	na	na	na	na
Total ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	56±6^a	487±25^b	3,1±0,4^c	3,4±0,6^a	42±2^b	5±1^a

Tal como foi descrito na secção 1.6.1. as amêndoas apresentam um teor de ácidos gordos insaturados (mono- e poliinsaturados) muito superior ao de ácidos gordos saturados, sendo esta característica considerada benéfica para a saúde, por a amêndoa ser considerada um alimento de baixo índice glicémico (Kamil e Chen, 2012). O mesmo cenário é observado na bebida de amêndoa, em que o teor de ácidos gordos insaturados (85 % do teor total de ácidos gordos) é superior ao teor de ácidos gordos saturados (25 % do teor total de ácidos gordos), bem como no resíduo de amêndoa em que 89 % do teor total de ácidos gordos corresponde a ácidos gordos insaturados. No soro de amêndoa verifica-se o oposto, i.e. o teor de ácidos gordos saturados (87 % do teor total de ácidos gordos) é superior ao teor de ácidos gordos insaturados (13 % do teor total de ácidos gordos).

A presença dos ácidos gordos - palmítico, palmitoléico, esteárico, oleico e linoleico na bebida de amêndoa e nos coprodutos é prevista, já que estes ácidos gordos fazem parte da composição do miolo da amêndoa, em particular os ácidos oleico (63-78 % do teor total de óleo) e linoleico (12-27 % do teor total de óleo) (Kodad e Socias, 2008). O ácido linoleico (ácido gordo precursor dos ácidos gordos ómega-6 bioativos) promove a redução significativa das concentrações de colesterol total e LDL quando é fornecido na dieta em substituição de ácidos gordos saturados (Wahrburg, 2004). O ácido oleico é um ácido gordo monoinsaturado não essencial que foi recentemente descrito como um regulador da função imune (Sales-Campus *et al.*, 2013). A presença de um elevado teor deste ácido gordo na dieta demonstrou levar a uma redução nos níveis de colesterol, no risco de aterogénese, na resposta do hospedeiro face a transplante, na pressão arterial e na ingestão diária de fármacos anti-hipertensivos. Além disso, demonstrou induzir efeitos benéficos anti-inflamatórios sobre doenças autoimunes, um efeito protetor sobre o cancro de mama e a melhoria da função do sistema imunológico (Sales-Campus *et al.*, 2013).

Em menores quantidades, está presente apenas no resíduo de amêndoa o ácido eicosapentaenóico (EPA), e na bebida e nos coprodutos, o ácido α -linolénico (ALA), que são ácidos gordos pertencentes à família ómega-3 que desempenham múltiplos benefícios para a saúde (Swanson *et al.*, 2012). Um dos benefícios do ómega-3 diz respeito à prevenção de doenças cardiovasculares, já que vários estudos feitos sugerem que este diminui o risco de arritmias, trombose, diminui os níveis de triglicédeos e lipoproteínas remanescentes, diminui a taxa de desenvolvimento de placa aterosclerótica, melhora a função endotelial, reduz respostas inflamatórias e contribui levemente para a diminuição da pressão sanguínea (Kris-Etherton *et al.*, 2003).

Em suma, a natureza dos ácidos gordos encontrados na bebida e nos coprodutos da amêndoa, fundamentalmente na bebida e no resíduo de amêndoa, representam inúmeros benefícios para a saúde como comprova a literatura.

3.4. Caracterização biológica

3.4.1. Atividade antioxidante

Segundo a literatura, as amêndoas, bem como as suas cascas possuem propriedades antioxidantes atribuídas a uma variedade de flavonoides, incluindo catequinas, flavonóis e flavononas (Blomhoff *et al.*, 2006). A capacidade antioxidante da bebida da amêndoa, bem como do soro e do resíduo de amêndoa foi, então, analisada por dois métodos diferentes. Os resultados da capacidade de captura do radical ABTS^{•+} e da capacidade de captura do radical DPPH da bebida e dos coprodutos encontram-se representados na Figura 3.2.

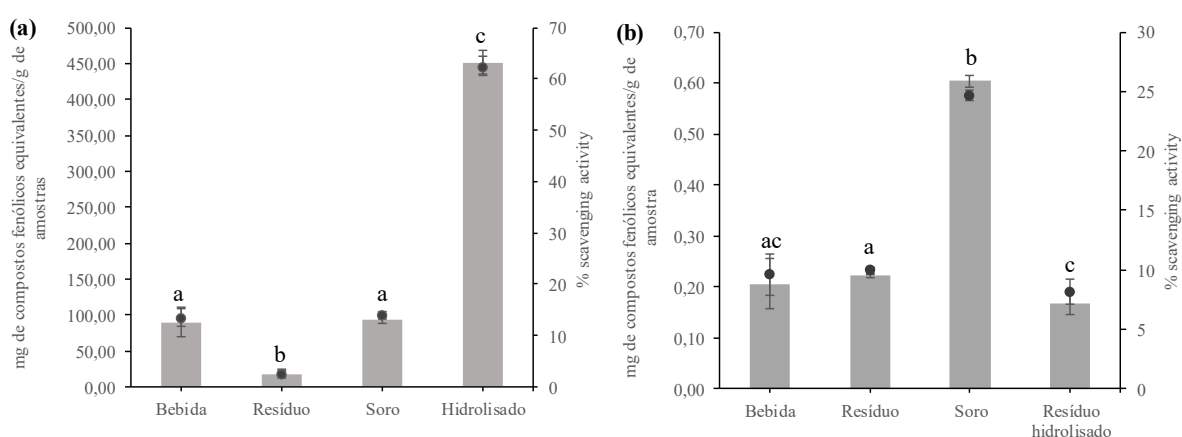


Figura 3.2. Concentração equivalente de compostos fenólicos (■) e percentagem de inibição (●) relativas à captura do radical do radical ABTS^{•+} (a) e à captura do radical DPPH (b) nas diferentes amostras de bebida, resíduo e soro de amêndoa e resíduo de amêndoa hidrolisado. Para cada amostra, valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p < 0,05$).

A capacidade de captura do radical ABTS^{•+} é muito superior no resíduo de amêndoa hidrolisado ($p > 0,05$) por comparação com a bebida, o soro e o resíduo de amêndoa *per si* (inibição percentual cerca de 5 vezes superior na bebida e no soro e 21 vezes superior no resíduo de amêndoa *per si*) (Figura 3.2a). A diferença entre o resíduo de amêndoa hidrolisado e não hidrolisado é enorme, verificando-se uma percentagem de inibição 21 vezes superior no resíduo hidrolisado. Rosset *et al.* (2012) referem que o tofu tratado com Viscozyme[®] L apresenta um aumento no conteúdo de glucose e galactose relativamente ao controlo (tofu não tratado com viscozyme), um maior teor de compostos fenólicos totais e uma maior capacidade antioxidante, nomeadamente no que toca à captura dos radicais ABTS^{•+} e DPPH. No entanto, neste estudo, a ação da Viscozyme[®] L parece ter tido muito pouca influência na captura do

radical DPPH, já que os valores obtidos para o resíduo de amêndoa hidrolisado e não hidrolisado não diferem muito entre si ($p>0,05$) (Figura 3.2b).

O soro de amêndoa mostra ter uma capacidade de captura do radical DPPH 3 vezes superior à bebida e ao resíduo (hidrolisado e não hidrolisado). Já no que diz respeito à captura do radical ABTS^{•+}, a bebida e o soro apresentam valores de inibição (%) iguais (14%) ($p<0,05$).

A capacidade de captura do radical ABTS^{•+} do resíduo de amêndoa hidrolisado (63 % de inibição) é equiparável à capacidade de captura do radical ABTS^{•+} de extratos aquosos de diferentes variedades de morango (50-90 % de inibição) (Cheplick *et al.*, 2009) - fruto reconhecido como sendo rico em antioxidantes-, pelo que se pode considerar que este possui a atividade antioxidante significativa. Já o soro destaca-se dos restantes ingredientes derivados da amêndoa pela sua capacidade de captura do radical DPPH (25 % de inibição), no entanto quando comparada com a capacidade de captura do radical DPPH de extratos aquosos de diferentes variedades de morango (85-42 % de inibição) (Cheplick *et al.*, 2009) esse valor parece não ser significativo.

3.4.2. Atividade antidiabética

Com o objetivo de se avaliar o potencial inibidor da enzima α -glucosidase na bebida e nos coprodutos da amêndoa procedeu-se à determinação da atividade antidiabética nestas três amostras comparando os valores obtidos com os de um controlo positivo (acarbose, utilizado como fármaco para reduzir os níveis de glucose no sangue). A atividade inibidora da α -glucosidase oscilou entre cerca de 10-30% para todas as amostras derivadas da amêndoa (Figura 3.3) em comparação com a da acarbose que variou entre 88 e 95 % de inibição.

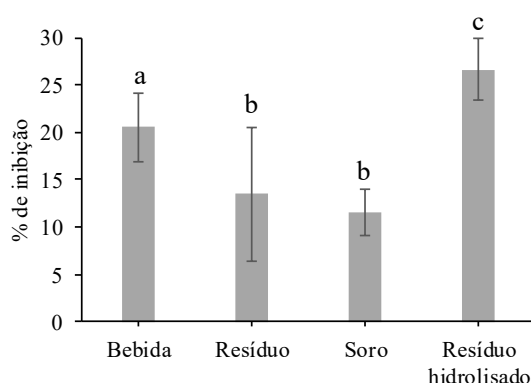


Figura 3.3. Percentagem de inibição da α -glucosidase determinada em amostras de bebida, resíduo e soro de amêndoa e de resíduo de amêndoa hidrolisado com viscozyme L. Valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p<0,05$).

Das três amostras em análise, a bebida de amêndoa apresentou a taxa de inibição mais elevada seguida dos coprodutos soro e resíduo de amêndoa com percentagens de inibição semelhantes entre si ($p>0,05$). Quando hidrolisado o resíduo de amêndoa duplicou a sua percentagem de

inibição da enzima α -glucosidase, observação que indica que a hidrólise enzimática com Viscozyme L potenciou um aumento da atividade antidiabética do resíduo, possivelmente pela libertação de algum composto com atividade inibidora sobre a enzima α -glucosidase. Esta hidrolisa o amido e dissacarídeos em glucose, promovendo uma maior concentração desta no sangue. Com a inibição desta enzima, além de reduzir a hiperglicemia, aumenta o tempo de digestão, incrementa a saciedade e desta forma diminui a necessidade de novas refeições.

3.4.3. Atividade prebiótica

Para a avaliação da atividade prebiótica da bebida de amêndoa e dos coprodutos, foi realizada inicialmente a avaliação em microplaca, passando-se *à posteriori*, para a avaliação em macroplaca. Quer numa avaliação quer noutra, foram utilizadas a bebida de amêndoa, o soro de amêndoa e o resíduo de amêndoa hidrolisado do lote 4 e o resíduo de amêndoa do lote 2, por razões relacionadas com a disponibilidade e quantidade de amostra disponível no momento das análises.

Crescimento em microplaca – determinação da densidade ótica

Numa primeira etapa foi realizado um *screening* para avaliar quais as amostras com maior potencial prebiótico recorrendo à leitura das absorvâncias, em microplaca, das amostras inoculadas com *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12. As curvas de crescimento determinadas em MRS suplementado com resíduo de amêndoa [2 e 4 % (m/v)], com resíduo de amêndoa hidrolisado [2 % (m/v)], com bebida de amêndoa e com mistura de bebida com soro (1:1) ao fim de 24h de incubação a 37°C podem ser observadas na Figura 3.4. É de notar que a pasteurização efetuada aos coprodutos e à bebida e soro foi eficaz na eliminação de microrganismos mesófilos e psicrófilos, já que não se observaram unidades formadoras de colónias acima do limite de deteção após pasteurização.

Da análise das curvas de crescimento ao longo do tempo podemos antever um maior potencial prebiótico para o soro (Figura 3.4a) e para o resíduo de amêndoa hidrolisado (Figura 3.4b) em comparação com a bebida de amêndoa ou com o resíduo de amêndoa a 2 ou 4 % (m/v), uma vez que foram aqueles os dois coprodutos derivados da amêndoa que permitiram um crescimento progressivo (uma variação de cerca de 0,6 unidades DO) semelhante ao registado com os controlos positivos glucose e FOS (Figura 3.4 a e b).

No caso das restantes matrizes: a bebida de amêndoa, a mistura de bebida e soro (Figura 3.4a), e os resíduos (a 2 e 4 % (m/v)) (Figura 3.4b) a absorvância manteve-se relativamente

constante ao longo do tempo de incubação denotando ausência de crescimento o que poderá indicar que estes componentes não apresentam atividade prebiótica associada. Tendo em conta estes valores menos esperados, avaliou-se de seguida a atividade prebiótica dos diferentes componentes da amêndoa em macroplaca.

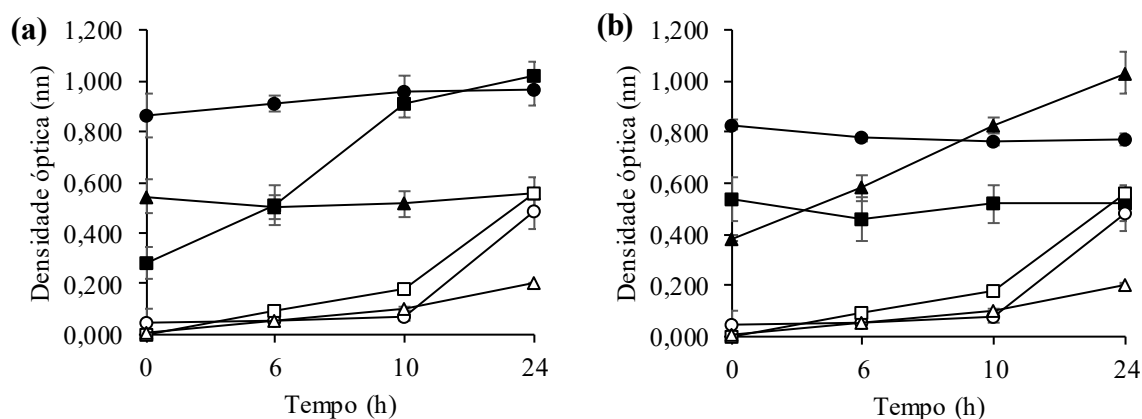


Figura 3.4. Curvas de crescimento de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (DO a 660 nm) em diferentes matrizes e respetivos controlos ao longo de 24 h de incubação a 37 °C: a) bebida de amêndoa (-●-), soro de amêndoa (-■-), e mistura do soro com a bebida (1:1) (-▲-) e respetivos controlos de MRS com glucose (-□-), FOS (-○-) e sem adição de fonte carbono (-△-); b) MRS com resíduo de amêndoa a 2% (-●-) e 4% (-■-) (m/v) ou com resíduo hidrolisado com Viscozyme® L a 2% (-▲-) (m/v) e respetivos controlos de MRS com glucose (-□-), FOS (-○-) e sem adição de fonte de carbono (-△-).

Determinação do número de células viáveis e pH

A evolução do número de células viáveis de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 e respetiva variação de pH ao longo de 48h de incubação a 37 °C podem ser observados na Figura 3.5.

Na Figura 3.5a podemos constatar que o soro de amêndoa promoveu um crescimento exponencial mais acelerado de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, tendo esta alcançado um máximo de 8,86 log UFCs/mL (incremento de 3 ciclos log) às 10 h de incubação, superando o valor máximo de 8,21 log UFCs/mL obtido com glucose (controlo positivo), registado às somente às 24h. A maior velocidade de crescimento registada pode indicar uma preferência de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 pela fonte de carbono presente no soro, acoplado a uma eventual maior riqueza de compostos azotados bifidogénicos. Tal crescimento repercutiu-se, também, numa diminuição acentuada do pH ao fim das 48h (Figura 3.5b). Estes resultados corroboram e confirmam os resultados obtidos no ensaio anterior de *screening* demonstrando o potencial prebiótico do soro de amêndoa. Contrariamente aos resultados obtidos no *screening* em microplaca, a bebida e a mistura da bebida com o soro, também revelaram uma influência positiva na promoção do crescimento de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (incremento de 3 ciclos log até 24 horas de incubação – Figura 3.5a) semelhante ao registado

com glucose e FOS (controles positivos). Conforme esperado, este crescimento exponencial foi acompanhado por uma diminuição do valor de pH (Figura 3.5b).

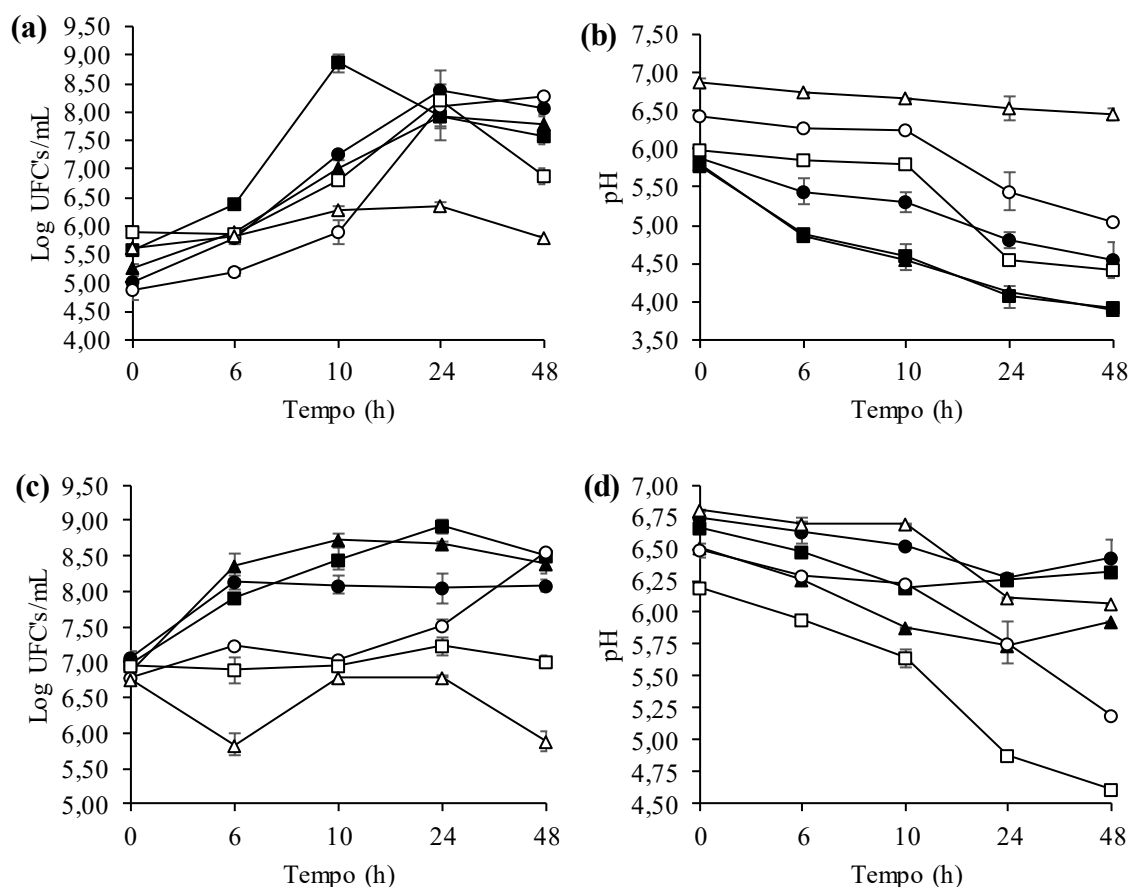


Figura 3.5. Evolução do número de células viáveis de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (a; c) e de valores de pH (b; d) em diferentes matrizes e respetivos controlos ao longo de 48 h de incubação a 37 °C: a) número de células viáveis em bebida de amêndoa (-●-), soro de amêndoa (-■-), e na mistura do soro com a bebida de amêndoa (1:1) (-▲-) e nos respetivos controlos de MRS com glucose (-□-), FOS (-○-) e sem adição de fonte carbónica (-△-); b) valores de pH nas mesmas amostras definidas em a; c) número de células viáveis em MRS com resíduo de amêndoa a 2% (-●-) e 4% (-■-) (m/v) ou com resíduo hidrolisado com Viscozyme® L a 2% (-▲-) (m/v) e respetivos controlos de MRS com glucose (-□-), FOS (-○-) e sem adição de fonte de carbono (-△-); d) valores de pH nas mesmas amostras definidas em c.

O impacto do resíduo de amêndoa, quer em termos de concentração quer em termos de natureza (hidrolisado vs não hidrolisado) no crescimento de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 está registado na Figura 3.5c. É possível notar um efeito positivo da hidrólise prévia do resíduo de amêndoa uma vez que permitiu uma maior taxa de crescimento além de alcançar um maior número de células viáveis (cerca de 0,7 ciclo log) em comparação com o resíduo de amêndoa a 2% (m/v); esta diferença de comportamento pode ser justificada pela maior disponibilidade da fonte de carbono. A concentração do resíduo também teve impacto no crescimento de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, uma vez que o resíduo de amêndoa a 4% (m/v) registou um crescimento cerca de um ciclo log superior (atingiu o valor mais elevado de

8,91 log UFCs/mL) do que o resíduo de amêndoa a 2 % (m/v). De facto, o resíduo de amêndoa a 4 % (m/v) e o resíduo de amêndoa hidrolisado a 2 % (m/v) permitiram ao *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 atingir valores máximos de células viáveis semelhantes. Curiosamente, apesar deste crescimento acentuado, o valor de pH correspondente não desceu tanto como nos controlos positivos (MRS com glucose ou com FOS; Figura 3.5d), o que pode indicar algum efeito tampão por parte destes coprodutos. No seu conjunto, estes resultados sugerem que tanto o resíduo de amêndoa hidrolisado como o resíduo de amêndoa a 4 % (m/v) apresentam atividade prebiótica.

Com base nos resultados obtidos, todas as matrizes de amêndoa testadas evidenciam atividade prébiótica, porém são, o soro de amêndoa, o resíduo de amêndoa na concentração de 4 % (m/v) e o resíduo de amêndoa hidrolisado na concentração de 2 % (m/v), aqueles que revelaram ser melhores fontes alternativas de carbono para crescimento de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12. Esta melhor atividade prebiótica pode estar relacionada com o facto destes coprodutos possuírem maior quantidade de açúcares totais do que a bebida, além de possuírem maior componente azotada e maior teor de fibra solúvel conforme reportado na literatura no caso do resíduo (ver secção 3.3).

As amêndoas possuem compostos que apresentam potencial prebiótico. Os pesquisadores Liu *et al.* (2014) estudaram os efeitos prebióticos da ingestão de amêndoas durante 8 semanas em pessoas saudáveis. Neste estudo, os indivíduos que consumiram uma dose diária de 56 g de amêndoas sem pele, mostraram um aumento significativo de *Bifidobacterium* spp. (de 9,75 para 10,47 log UFC/g) em amostras de fezes, entre o início e o final das 8 semanas. No entanto o grupo controlo suplementado com FOS atingiu um máximo de 11,04 log UFC/g às 3 semanas, o que supera o valor máximo obtido pelo grupo das amêndoas sem pele (10,47 log UFC/g). Comparando com os resultados obtidos com soro de amêndoa, resíduo de amêndoa [4 % (m/v)] e resíduo de amêndoa hidrolisado [(2 % (m/v))] com os valores obtidos no estudo de Liu *et al.* (2014), estes revelam-se inferiores (8,7-8,9 log UFC/g), no entanto permitiram maiores taxas de crescimento (entre 2 a 3 ciclos log).

3.5. Produção de bebidas fermentadas

Numa segunda parte deste estudo pretendia-se estudar a viabilidade de desenvolver novos alimentos e/ou bebidas utilizando as amostras de bebida de amêndoa e os coprodutos seleccionados. Assim, avaliou-se, em dois ensaios independentes (Ensaio 1 e 2), a produção de duas bebidas fermentadas simbióticas, tendo como base apenas o soro de amêndoa (BFS) ou em mistura (1:1) com a bebida de amêndoa (BFM), conforme ilustradas pela Figura 3.6. A

BSF tem um aspeto muito semelhante ao soro de amêndoa, matéria-prima que lhe deu origem, enquanto que a BMF tem um aspeto semelhante à bebida de amêndoa, notando-se-lhes um odor a amêndoa mais intenso do que nas matérias-primas.

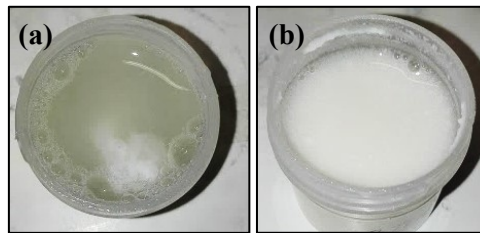


Figura 3.6. Bebidas fermentadas com *B. animalis* subsp. *lactis* BB12: (a) bebida de soro de amêndoa fermentada (BSF) e (b) bebida de mistura soro e bebida de amêndoa fermentada (1:1) (BMF).

3.5.1. Estabilidade microbiana e pH

Ensaio 1. A evolução do número de células viáveis de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 e de *S. thermophilus*, bem como a variação de pH durante a fermentação e durante o período de armazenamento no frio encontram-se registados na Figura 3.7. Quer a bebida de soro de amêndoa não fermentada (BSNF), quer a bebida de mistura não fermentada (BMNF) não apresentaram contaminações ao longo de todo o período de análise, pelo que comprovam a eficácia do tratamento térmico efetuado às bebidas (90°C durante 10 min).

Neste primeiro ensaio, registou-se uma diferença no tempo necessário para o *B. animalis* subsp. *lactis* BB12 fermentar as matrizes até ao valor de pH próximo de 4,5 estabelecido previamente: na BSF registou-se um valor de pH de 4,5 após 3,5h de fermentação, enquanto na BMF foi necessário mais uma hora para se atingir o mesmo valor de pH (Figura 3.7b). O número de células viáveis de *S. thermophilus* evoluiu positivamente tendo aumentado em cerca de dois ciclos log para 7,5 e 7,9 log UFC's/mL ao fim de 3,5 e 4,5h, na BSF e na BMF, respetivamente (Figura 3.7a). O *B. animalis* subsp. *lactis* BB12 também apresentou uma evolução positiva do número de células viáveis ao longo do tempo de fermentação, porém alcançaram números cem vezes inferiores aos de *S. thermophilus* (5,8-6 log UFC/mL) consequência do baixo inóculo inicial. Tendo em conta que se pretende uma bebida simbiótica o número de células viáveis de *B. animalis* subsp. *lactis* BB12 está abaixo do limite mínimo desejável para que um efeito probióticos possa ser garantido (7 log UFC's/mL) (Gomes *et al.*, 2017).

Ao longo do tempo de armazenamento, o número de células viáveis de *S. thermophilus* manteve-se praticamente estável nas duas bebidas fermentadas, até aos 14 dias, altura a partir da qual entrou em declínio abrupto tendo decrescido cerca de dois ciclos log (Fig. 3.7c). Já no caso de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, o número de células viáveis manteve-se praticamente

constante na BSF ao longo dos 21 dias de armazenamento, enquanto que na BMF registou um aumento inesperado no número de células viáveis de cerca de 1,5 ciclos log entre os 0 e os 7 dias de armazenamento, momento a partir do qual estabilizou até aos 21 dias. No que diz respeito ao pH, este manteve-se razoavelmente constante ao longo de todo o período de armazenamento nas duas bebidas fermentadas, tendo variado entre 4,4 e 4,5 (Fig. 3.7d).

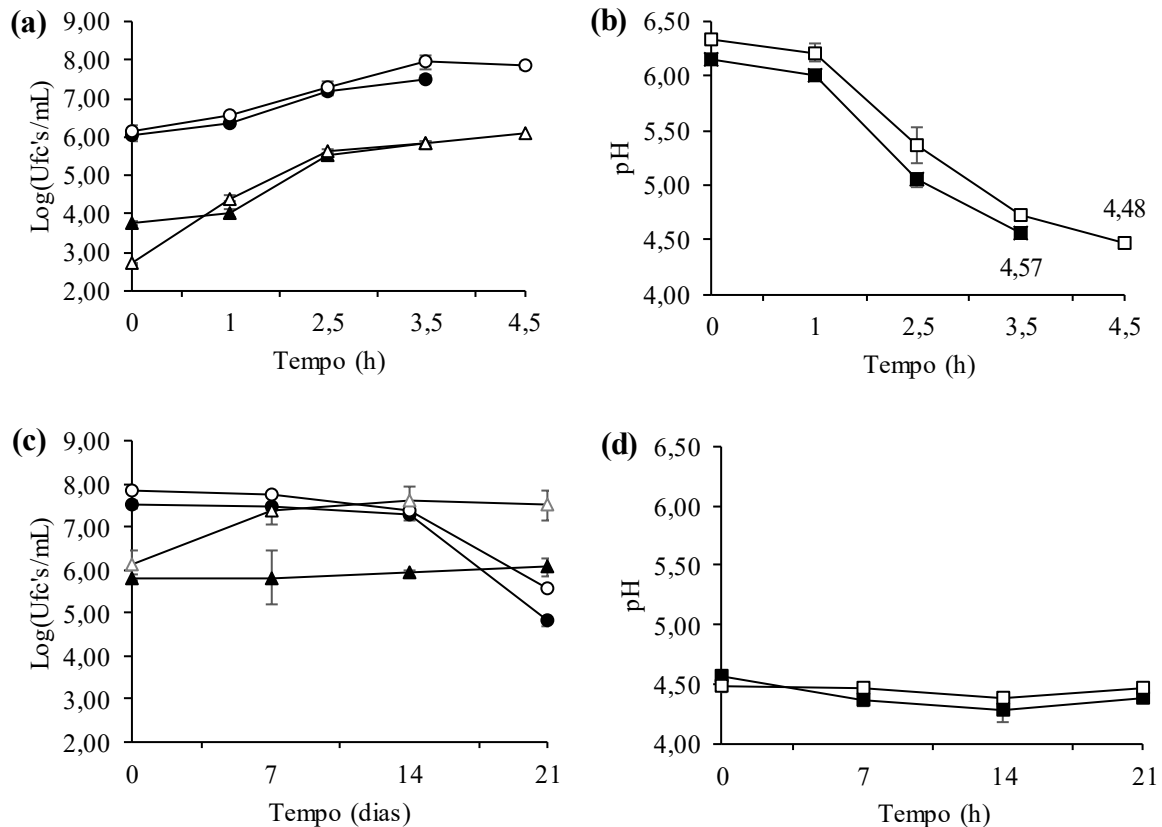


Figura 3.7. Evolução do número de células viáveis de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (-▲-;-△-) e *S. thermophilus* (-●-;-○-) (a;c) e variação de pH (-■-;-□-) (b;d), na bebida de soro de amêndoa fermentada (BSF) (-▲-;-●-;-■-) e na bebida de mistura fermentada (BMF) (-△-;-○-;-□-) ao longo do tempo de fermentação a 37 °C (a;b) e ao longo do tempo de armazenamento (0-21 dias) sob condições de refrigeração (c;d).

Ensaio 2. Tendo em conta, a reduzida densidade no inóculo de *B. animalis* subsp. *lactis* BB12 no primeiro ensaio, repetiu-se o planeamento experimental. Neste ensaio, ocorreu um problema com a deteção de células viáveis de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, tendo só detetada às 4h de fermentação no caso da BSF, e às 6h no caso da BMF (Figura 3.8a). Por esta razão, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 alcança valores bastante inferiores (100 vezes inferiores) aos de *S. thermophilus* no final da fermentação, semelhante ao que ocorrera no ensaio anterior.

O crescimento de *S. thermophilus* evoluiu de forma positiva apresentando um crescimento exponencial entre 1 e 4 horas de fermentação, estabilizando depois o seu crescimento até as 6

h para um valor semelhante ao registado anteriormente (7,5 log UFC's/mL). Neste caso, ambas as bebidas demoraram o mesmo tempo, a atingir um valor de pH próximo de 4,5 (6 h). Porém, o abaixamento do pH demorou mais tempo a ocorrer do que no Ensaio 1, justificado provavelmente pelo problema ocorrido com o inóculo de BB-12 (Figura 3.8b). Ao longo do período de armazenamento, as duas bebidas fermentadas apresentaram o mesmo comportamento em relação ao pH, já que houve uma ligeira diminuição do mesmo nos primeiros 7 dias, estabilizando até ao final dos 21 dias, o que se mostra concordante com o facto de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 ter-se desenvolvido nos primeiros 7 dias de armazenamento, tal como aliás havia ocorrido na BMF no ensaio anterior. *S.thermophilus* manteve-se estável até aos 14 dias, entrando depois em fase de declínio (Figura 3.8c). É de realçar a surpreendente capacidade de recuperação de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, que mesmo presente em baixa concentração no inóculo inicial conseguiu atingir valores de ordem de grandeza semelhantes aos conseguidos por *S.thermophilus* (10^7), já em período de armazenamento no frio.

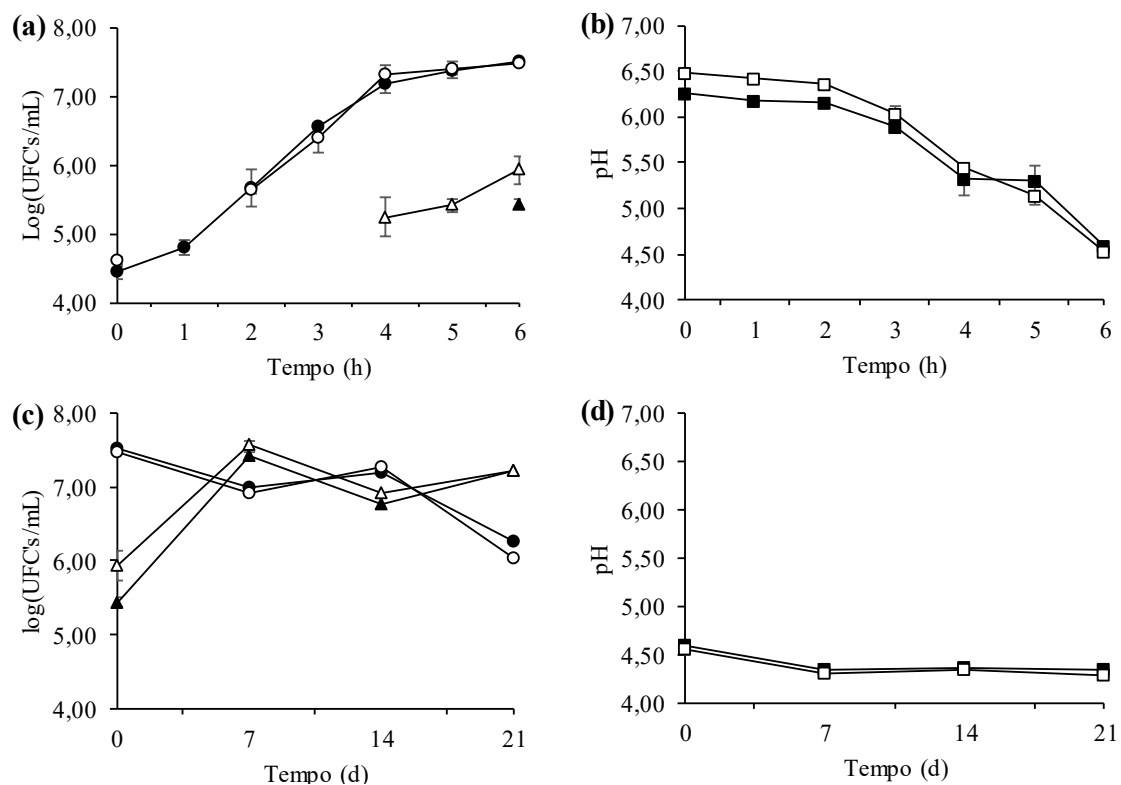


Figura 3.8. Evolução do número de células viáveis de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (-▲-;-△-) e *S. thermophilus* (-●-;-○-) (a;c) e variação de pH (-■-;-□-) (b;d), na bebida de sorvo de amêndoa fermentada (BSF) (-▲-;-●-;-■-) e na bebida de mistura fermentada (BMF) (-△-;-○-;-□-) ao longo do tempo de fermentação a 37 °C (a;b) e ao longo do tempo de armazenamento (0-21 dias) sob condições de refrigeração (c;d).

Assim, apesar dos problemas ocorridos com a deteção da *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, os dois conjuntos de resultados obtidos através dois ensaios são bastante reprodutíveis. Tendo

em conta os dados do Ensaio 1, a acidificação ocorre de forma bastante rápida num período mínimo de entre 3,5 e 4,5h. Graças às quantidades significativas de fibras e polifenóis presentes nas amêndoas, estas formam certamente um substrato importante para a fermentação microbiana no intestino e, portanto, podem facilitar a manutenção ou seleção de uma composição saudável da microbiota. Assim, aparentemente o soro e bebida de amêndoa, possuem os nutrientes necessários ao desenvolvimento das duas bactérias (*S. thermophilus* e *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12), constituindo bons ingredientes para a produção de bebidas vegan fermentadas.

3.5.2. Caracterização química

No que diz respeito à acidez titulável (Figura 3.9a), é possível constatar que a acidez titulável da BSF se mantém constante ($p>0.05$) ao longo dos 21 dias de armazenamento, enquanto que no caso da BMF a acidez titulável aumenta cerca de 0,2 unidades ao longo dos 21 dias de armazenamento. Este aumento na acidez titulável pode ser justificado pelo crescimento de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 ocorrido nos primeiros 7 dias de armazenamento (Figura 3.8c). Os valores de acidez titulável das bebidas após a fermentação são naturalmente superiores aos valores de acidez titulável encontrados nas matérias-primas (bebida de amêndoa e soro de amêndoa) (Figura 3.1a), já que a fermentação é acompanhada pela formação de ácidos orgânicos como por exemplo ácido láctico e acético.

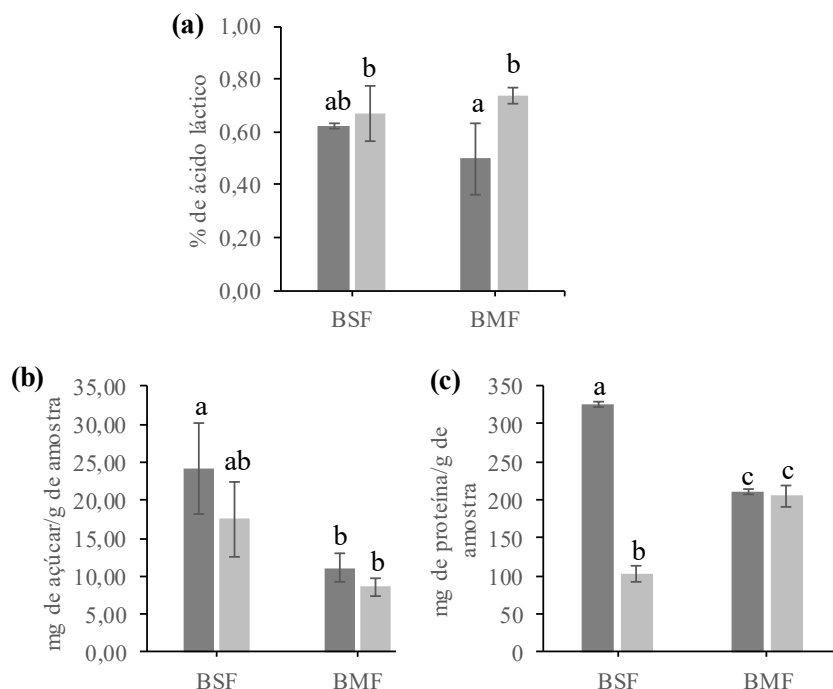


Figura 3.9. Teor de acidez titulável (a), açúcares totais (b) e de proteína total (c) em bebida de soro de amêndoa fermentada (BSF) e em bebida de mistura fermentada (BMF) após 0 (■) e 21 (▒) dias de armazenamento sob refrigeração decorrentes do ensaio 2. Valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa no que ao tempo de armazenamento diz respeito ($p>0,05$).

O teor de açúcares totais presentes nas duas bebidas após a fermentação encontra-se representado na Figura 3.9b. É possível concluir que, no final da fermentação, a BSF contém cerca do dobro de açúcares totais em relação à BMF. Possuindo o soro de amêndoa um maior teor de açúcar total do que a bebida de amêndoa (Figura 3.1b), é de esperar que no início da fermentação a BSF seja mais rica em açúcar total do que a BMF. Comparativamente aos teores de açúcares totais presentes nas matérias-primas é possível confirmar o consumo de açúcares por parte das bactérias intervenientes na fermentação. Uma vez que o *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 continuou a multiplicar-se durante os primeiros 7 dias de armazenamento seria expectável uma diminuição no teor de açúcares totais ao longo dos 21 dias de armazenamento, o que de facto ocorreu como comprovam os resultados obtidos (Figura 3.8c). No entanto, essa diminuição não se mostrou estatisticamente significativa ($p>0,05$).

No que diz respeito à concentração de proteína total presente nas bebidas fermentadas (Figura 3.9c), observa-se que a fermentação potenciou em larga escala (9-17 vezes superior) o aumento da concentração deste nutriente face aos valores obtidos nas matérias-primas (Figura 3.1c). Este aumento hipoteticamente pode estar relacionado com a secreção de proteínas produzidas pela(s) bactéria(s) intervenientes no processo fermentativo. Gilad *et al.* (2011), identificaram 74 proteínas secretadas por *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 pertencentes ao proteoma extracelular presente no meio de cultura (MRS contendo 0,05% (m/v) de cisteína), entre as quais algumas com funções que incluem ligação do plasminogénio, formação de fímbrias, adesão ao colágeno, ligação a mucina e células intestinais, bem como indução de resposta imunomoduladora do sistema imune do hospedeiro. Estas interações medeiam efeitos probióticos que em alguns casos foram relatados como facilitados pela ação de proteínas ou peptídeos exportados por (entre outros) bifidobactérias. Estas proteínas são secretadas para o exterior da célula ou podem permanecer ligadas à membrana celular bacteriana. Este estudo, dá suporte aos resultados obtidos, já que parece ter ocorrido a secreção de proteínas durante a fermentação. Ao longo do tempo de armazenamento o teor de proteína total mantém-se estável na BMF ($p>0,05$) mas diminui significativamente ($p<0,05$) na BSF para valores três vezes inferiores.

3.5.3. Caracterização biológica

3.5.3.1. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante relativa à captura do radical $ABTS^{+}$ encontrada nas bebidas fermentadas (Figura 3.10a), quer no final da fermentação, quer aos 21 dias de armazenamento no frio, não difere muito da encontrada nas matérias primas (Figura 3.2a), pelo que o processo

de fermentação e de armazenamento no frio parecem não ter tido qualquer influência nesta propriedade. Em contrapartida, a capacidade antioxidante providenciada pela captura do radical DPPH (Figura 3.10b), perdeu-se com o processo de fermentação, tendo ocorrido uma diminuição da inibição (%) (2-3 vezes inferior) relativamente ao registado para as matérias-primas (Figura 3.2b). A capacidade de captura do radical DPPH manteve-se praticamente estável durante o armazenamento nas duas bebidas, enquanto que a capacidade de captura do radical ABTS^{•+} aumentou entre os 0 e os 21 dias de armazenamento ($p < 0,05$).

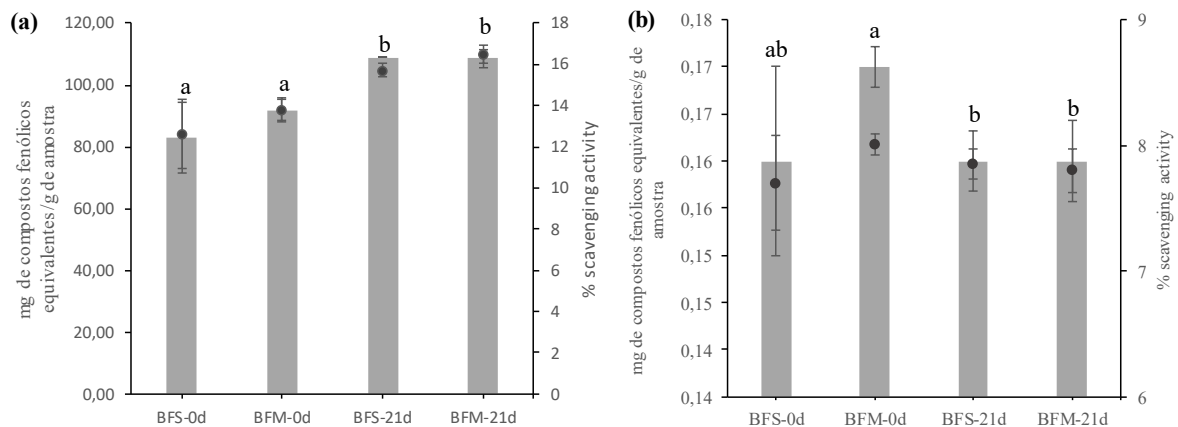


Figura 3.10. Concentração equivalente de compostos fenólicos (■) e percentagem de inibição (●) relativas à captura do radical do radical ABTS^{•+} (a) e à captura do radical DPPH (b) em bebida de soro de amêndoa fermentada (BFS) e em bebida de mistura fermentada (BFM) após 0 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração decorrentes do ensaio 2. Para cada amostra, valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p < 0,05$).

Existem diversos mecanismos subjacentes que podem afetar a atividade antioxidante durante a fermentação, nomeadamente o tipo de microrganismos, meio de cultura, tempo e temperatura de fermentação, pH, inibidores, estimuladores ou as condições de atmosfera (Hur *et al.*, 2014). A fermentação de matrizes vegetais induz a quebra estrutural das paredes celulares das plantas, podendo levar à liberação ou síntese de vários compostos antioxidantes. Durante a fermentação de bactérias do ácido láctico, como é o caso das bactérias intervenientes neste processo fermentativo, também ocorrem reações de hidrólise nomeadamente por parte de β -glucosidases, que promovem hidrólise de glicosídeos fenólicos e a liberação de agliconas livres, que podem ser responsáveis por elevados valores de atividade antioxidante (Hur *et al.*, 2014). Entre os efeitos benéficos dos probióticos, a proteção contra o stresse oxidativo tem sido relatada por vários autores (Naruszewicz *et al.*, 2002; Songisepp *et al.*, 2005; Virtanen *et al.*, 2007). Por estas razões seria mais expectável a ocorrência de um aumento da atividade antioxidante, no entanto tal não se verificou, pelo que seriam necessários mais ensaios para entender melhor estes resultados.

3.5.3.2. Atividade antidiabética

No que diz respeito à atividade antidiabética das bebidas fermentadas, existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as duas bebidas no final da fermentação, já que a BSF possui uma percentagem de inibição da enzima α -glucosidase 2 vezes superior (Figura 3.11).

Neste caso, em relação às matérias-primas, o processo fermentativo parece ter contribuído para uma diminuição da atividade antidiabética apenas na BMF, já que a BSF mantém um valor de inibição da enzima α -glucosidase semelhante ao encontrado na matéria-prima (soro de amêndoa) (Figura 3.3). Aos 21 dias de armazenamento, a atividade antidiabética detetada atingiu valores de inibição da enzima α -glucosidase muito baixos (4 e 2 vezes inferiores na BSF e BMF, respetivamente) e semelhantes entre as duas bebidas. Esta perda de atividade poderá estar relacionada com a diminuição de concentração de substrato. Uma vez que de acordo com o meu conhecimento não existem trabalhos semelhantes na literatura, não é possível uma discussão das tendências obtidas.

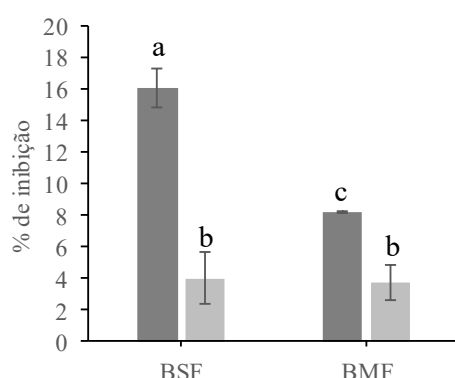


Figura 3.11. Percentagem de inibição da α -glucosidase determinada em bebida de soro de amêndoa fermentada (BSF) e em bebida de mistura fermentada (BMF) após 0 (■) e 21 (■) dias de armazenamento sob refrigeração decorrentes do ensaio 2. Valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p < 0,05$).

3.6. Produção de cremes de amêndoa para barrar

O segundo alimento desenvolvido foi um creme de amêndoa para barrar no qual foi incorporado o resíduo de amêndoa. Na Figura 3.12 encontram-se representados os três cremes de amêndoa para barrar que foram desenvolvidos, sendo o aspeto entre eles muito semelhante, à exceção do CNP (Figura 3.12a) que não foi pasteurizado, e que apresenta uma coloração mais mármore do que os outros dois cremes que foram pasteurizados (CP e CPP) (Figura 3.12b e c). O processo térmico parece ter alterado a coloração dos cremes CP e CPP, tornando a sua coloração mais branca. De notar que o resíduo utilizado na produção dos três cremes pertencia ao lote 4.

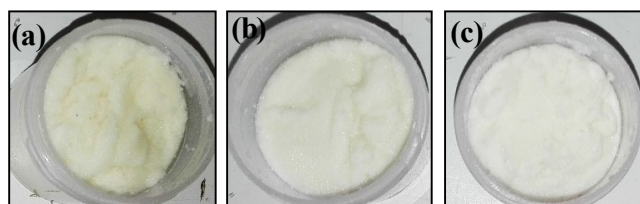


Figura 3.12. Cremes de amêndoa para barrar: a) Creme de barrar não pasteurizado (CNP), b) Creme de barrar pasteurizado (CP) e, c) Creme de barrar pasteurizado probiótico com *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (CPP).

3.7. Estabilidade microbiana e pH

Os resultados relativos à estabilidade microbiana e à evolução do valor de pH ao longo de 14 dias de armazenamento sob refrigeração para os diferentes cremes podem ser analisados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Número de células viáveis de diferentes microrganismos em cremes de barrar não pasteurizado (CNP), pasteurizado (CP) e pasteurizado probiótico (CPP), e respectivos valores de pH ao longo de 14 dias de armazenamento sob refrigeração.

Microrganismos (log UFC/g) e pH	Tempo (d)	CNP	CP	CPP
pH	0	4,38±0,00 ^a	4,69±0,02 ^a	4,59±0,01 ^a
	7	4,41±0,00 ^b	4,47±0,01 ^b	4,54±0,00 ^b
	14	4,17±0,00 ^c	4,41±0,00 ^c	4,31±0,00 ^c
Bolores e leveduras	0	5,38±0,25 ^a	5,49±0,04 ^a	3,93±0,07 ^a
	7	6,96±0,07 ^b	7,66±0,03 ^b	6,84±0,11 ^b
	14	7,95±0,07 ^c	7,73±0,06 ^b	7,49±0,07 ^c
Enterobactérias	0	3,54 ^a	<2,48 ^a	<2,48 ^a
	7	3,54±0,09 ^a	<2,48 ^a	<2,48 ^a
	14	<2,48 ^b	<2,48 ^a	<2,48 ^a
Bactérias do ácido láctico	0	5,49±0,07 ^a	5,53±0,04 ^a	4,04±0,08 ^a
	7	6,84±0,10 ^b	6,67±0,06 ^b	7,18±0,02 ^b
	14	7,89±0,11 ^c	7,85±0,14 ^c	7,49±0,01 ^c
Mesófilos e psicrófilos totais	0	5,15±0,08 ^a	5,55±0,05 ^a	4,15±0,02 ^a
	7	6,98±0,06 ^b	7,73±0,07 ^b	6,97±0,16 ^b
	14	7,92±0,02 ^c	7,61±0,07 ^b	7,57±0,06 ^c
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	0	NA	NA	7,41±0,07 ^{ab}
	7	NA	NA	7,32±0,03 ^b
	14	NA	NA	7,48±0,03 ^a

Nota: Para cada amostra, valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$); NA: não aplicável

A pasteurização a uma temperatura de 90 °C durante 10 min não foi totalmente eficaz na eliminação de leveduras, bactérias lácticas e mesófilos e psicrófilos totais presentes originalmente na matéria-prima (ver Tabela 3.1). Uma solução passaria por aumentar o tempo de pasteurização. Não se registou uma evolução no número de células viáveis de enterobactérias ao longo dos 14 dias de armazenamento nos cremes CP e CPP (Tabela 3.5). Os valores apresentados para o grupo dos bolores e leveduras referem-se apenas a leveduras, já que não foram detetados bolores. Os números de células viáveis dos restantes grupos de

microrganismos analisados aumentaram gradualmente ao longo dos 14 dias de armazenamento no frio; o número de células viáveis de *B. animalis* ssp. *lactis* BB-12 mantiveram-se estáveis ao longo do armazenamento e dentro da ordem de grandeza de 10^7 UFC/g necessária para promover um efeito probiótico.

Analisando a evolução do valor de pH (Tabela 3.5), é possível constatar que houve uma ligeira acidificação de cerca de 0,2 unidades nos três cremes ao longo dos 14 dias de armazenamento. O valor de pH inicial dos cremes CP e CPP é semelhante (4,69 e 4,59), enquanto que o pH inicial do CNP é ligeiramente mais ácido (4,38) – estes valores de pH mais ácidos relativamente à matéria prima original devem-se à adição de sumo de limão na formulação e eventualmente a alguma atividade microbiana contaminante ou propositada (CPP). A acidificação ocorrida é acompanhada pelo desenvolvimento dos diferentes microrganismos avaliados, que não foram eliminados pelo processo de pasteurização.

3.7.3. Caracterização química

Em termos de acidez titulável, é possível constatar, pela Figura 3.13, que esta aumentou ao longo dos 14 dias em todos os cremes de amêndoa para barrar o que é expetável, já que o pH também diminuiu de forma correspondente (Tabela 3.5); os valores de acidez titulável aos 0 dias são significativamente diferentes ($p < 0,05$) dos valores de acidez titulável após 14 dias de armazenamento. O creme para barrar CNP é o que possui maior acidez no início e no fim do período de armazenamento, o que é concordante com os valores de pH ligeiramente mais baixos verificados neste creme em igual período e com a carga microbiana láctica associada. A acidificação ocorrida nos três cremes de amêndoa para barrar pode dever-se-á possivelmente ao desenvolvimento dos vários microrganismos nomeadamente de bactérias lácticas nos 3 cremes e de *B. animalis* ssp. *lactis* BB-12 no CPP ao longo dos 14 dias de armazenamento no frio.

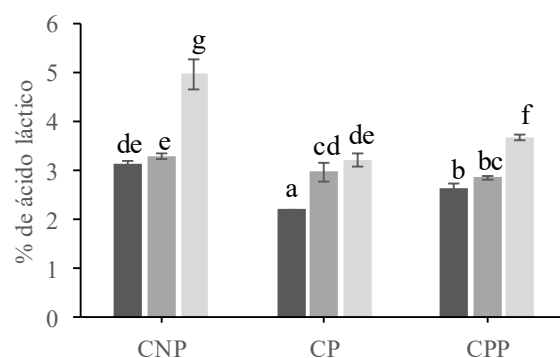


Figura 3.13. Valores de acidez titulável em creme de barrar não pasteurizado (CNP), creme de barrar pasteurizado (CP) e em creme de barrar pasteurizado probiótico (CPP) após 0 (■), 7 (■) e 14 dias de armazenamento (■) sob refrigeração. Valores com a mesma letra subscripta não demonstram diferença significativa ($p < 0,05$).

No que respeita ao teor de açúcares totais e de proteínas totais (Figura 3.14), estes não diferiram significativamente entre os três cremes após produção ($p>0,05$), pelo que não se verificou qualquer influência da pasteurização ou da inoculação com *B. animalis* ssp. *lactis* BB-12 no teor desses nutrientes.

O teor de açúcares totais dos cremes variou entre 45,6 e 58,2 mg/g, sendo esse teor 3 a 4 vezes inferior ao encontrado no resíduo de amêndoa (Figura 3.1b), o principal ingrediente dos cremes para barrar. Também no que diz respeito ao teor de proteína total, este varia entre 109,2 e 116,3 mg/g nos cremes para barrar, o que é cerca de 3 vezes inferior ao encontrado no resíduo de amêndoa (Figura 3.1c). Estes resultados devem-se certamente à influência dos outros ingredientes usados para na produção dos cremes, que exercem influência sobre o teor destes nutrientes

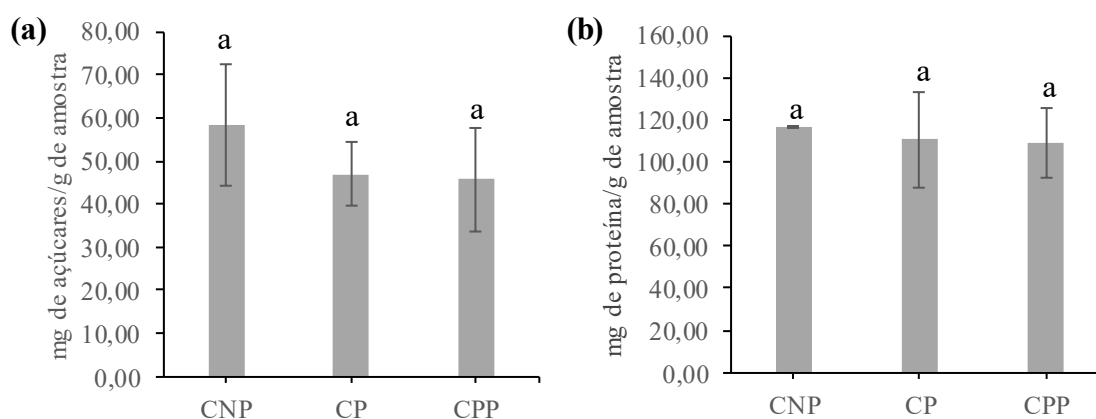


Figura 3.14. Teor de açúcares totais (a) e de proteínas totais (b) em cremes de barrar não pasteurizado (CNP), pasteurizado (CP) e pasteurizado probiótico (CPP) após a sua produção. Valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p<0,05$).

No que diz respeito ao seu conteúdo em ácidos gordos totais (Tabela 3.6), o creme CP após produção possui um perfil qualitativo e quantitativo semelhante ao da matéria-prima resíduo (Tabela 3.4). No entanto, este creme possui maior concentração de outros ácidos gordos, nomeadamente, o ácido capróico (C6:0), ácido caprílico (C8:0), o ácido cáprico (C10:0), o ácido láurico, o ácido mirístico (C14:0) e o C18:1 *t*15. Também a proporção de ácidos gordos esterificados é muito superior à de ácidos gordos livres, à semelhança do registado no resíduo. A presença abundante destes outros ácidos gordos no creme CP, deve-se a um dos ingredientes utilizado na preparação dos cremes, nomeadamente o óleo de coco, que é maioritariamente constituído pelos ácidos láurico (47,7 % de ácidos gordos totais) e mirístico (19,9 % de ácidos gordos totais) (Orsavova *et al.*, 2015), aparecendo em quantidades muito reduzidas também no resíduo da amêndoa.

Tabela 3.6. Teor de ácidos gordos esterificados e não esterificados em amostras de creme de barrar pasteurizado (CP); na: não aplicável.

Ácidos gordos	Esterificados (µg/mg)	Livres (µg/mg)
C4:0	0,033±0,001	na
C5:0	na	0,013±0,001
C6:0	1,76±0,01	0,016±0,002
C7:0	na	0,021±0,002
C8:0	24±0,3	2,00±0,08
C9:0/DMF	na	3,4±0,3
C10:0	19,69±0,3	1,39±0,07
C11:0 FFA	na	0,342±0,000
C12:0	151±2	0,342±0,000
C13:0	0,646±0,000	10,1±0,5
C14:0	56,4±0,9	0,040±0,001
C14:1	0,007±0,001	3,8±0,2
C15:0	0,042±0,001	0,003±0,000
C16:0 <i>iso</i>	0,024±0,001	na
C15:1	0,004±0,000	0,002±0,000
C12:0 3OH	0,021±0,001	na
C16:0	36±0,5	2,73±0,05
C16:1 <i>c7</i>	0,041±0,002	0,004±0,000
C16:1 <i>c9</i>	0,942±0,004	0,083±0,003
C17:0 <i>iso</i>	0,029±0,001	0,004±0,000
C17:0 <i>aiso</i>	0,004±0,000	na
C17:0	0,113±0,003	0,012±0,001
C17:1 <i>c10</i>	0,152±0,001	na
C17:1 <i>c16</i>	na	0,014±0,001
C18:0	13,4±0,2	1,01±0,02
C18:1 <i>t4</i>	0,005±0,001	na
C18:1 <i>t6t9</i>	0,078±0,004	0,016±0,001
C18:1 <i>t10</i>	0,038±0,000	0,008±0,001
C18:1 <i>c9</i>	13±1	12,0±0,4
C18:1 <i>t15</i>	2,20±0,03	na
C18:1 <i>c11</i>	0,036±0,001	0,209±0,007
C18:1 <i>c12</i>	na	0,006±0,001
C18:1 <i>c13</i>	0,004±0,000	0,005±0,001
C18:2 <i>t9t12</i>	0,047±0,003	0,011±0,001
C18:2 <i>c9t12</i>	0,010±0,001	0,002±0,000
C18:2 <i>c9c12</i>	34,6±0,2	3,1±0,1
C18:2 <i>c9c15</i>	0,028±0,001	0,006±0,001
C18:3 <i>c6c9c13</i>	0,009±0,000	0,002±0,000
C18:3 <i>c9c12c15</i>	0,072±0,003	0,009±0,001
C20:0	0,39±0,02	0,033±0,002
C18:2 <i>c9t11</i>	0,013±0,000	0,006±0,000
C20:1 <i>c7</i>	0,051±0,005	0,020±0,000
C20:1 <i>c9</i>	0,202±0,004	na
C20:1 <i>c11</i>	0,011±0,001	na
C21:0	0,009±0,001	na
C22:0	0,062±0,002	0,008±0,000
EPA 20:5 (<i>n-3</i>)	0,024±0,000	0,022±0,001
C21:5 (<i>n-3</i>)	0,020±0,000	0,022±0,001
C23:0	0,53±0,05	0,018±0,001
C20:2 <i>c13c16</i>	0,032±0,002	0,45±0,02
C20:1 (<i>n-iso</i>)	0,041±0,000	0,026±0,001
C24:0	0,076±0,002	0,006±0,000
C22:6 (DHA) (<i>n-3</i>)	0,013±0,000	na
Total (µg/mg)	476±6	41±2

O óleo de coco também possui quantidades significativas de ácidos caproico (0,2-08 % de ácidos gordos totais), caprílico (6-9 % de ácidos gordos totais) e cáprico (6-10 % de ácidos gordos totais), mas também de ácidos gordos típicos da amêndoa como os ácidos palmítico (8-10 % de ácidos gordos totais), esteárico (2-3 % de ácidos gordos totais), oleico (5-7 % de ácidos gordos totais) e linoleico (1-2,5 % de ácidos gordos totais) (Gervajio, 2000).

Os ácidos caprílico, cáprico e o láurico fazem parte de um conjunto de ácidos gordos designados por ácidos gordos de cadeia média (C8-C12), que são mais fáceis de digerir do que os ácidos gordos de cadeia longa, sendo absorvidos e oxidados mais rapidamente (DebMandal e Mandal, 2001; Kabara, 2000). Para além disso, são menos depositados no tecido adiposo, diminuem o catabolismo de proteínas em estados hiper-catabólicos, aumentam a função da tireóide e não formam ésteres com colesterol (Kabara, 2000). Outros estudos mostram que o ácido láurico exerce um efeito bactericida contra a bactéria *Helicobacter pylori*, associada ao aparecimento de cancro no estômago (Petschow, et al., 1996). Os ácidos láurico, mirístico e palmítico influenciam significativamente o colesterol total e o colesterol-LDL. Estes ácidos gordos reduzem a atividade dos recetores de LDL e, com isso, diminuem a captação celular de LDL. Os ácidos gordos de cadeia curta (C4:0-C10:0), bem como o ácido esteárico (C18:0) não causam um aumento significativo dos níveis de colesterol. No entanto, para o ácido esteárico, foi descrito um efeito de diminuição do nível de colesterol-HDL (Wahrburg, 2004).

O creme CP produzido neste estudo, parece reunir um conjunto de ácidos gordos benéficos para a saúde, que advêm dos ingredientes que os constituem, nomeadamente o resíduo da amêndoa e o óleo de coco, sendo, portanto, um produto interessante do ponto de vista nutricional. De futuro seria importante avaliar o perfil de ácidos gordos dos restantes cremes (CNP e CPP) e, também, analisar se existe alguma variação ao longo do período de armazenamento.

3.5.3. Caracterização biológica

3.5.3.1. Atividade antioxidante

Os resultados da atividade antioxidante dos cremes de amêndoa para barrar após produção, nomeadamente referentes à captura do radical ABTS^{•+} e à captura do radical DPPH encontram-se na Figura 3.15.

O creme CNP registou uma capacidade de captura do radical ABTS^{•+} um pouco superior ao CP e CPP. Não se observam diferenças significativas entre a capacidade de captura do radical

DPPH entre o resíduo de amêndoa (10% de inibição, Figura 3.2b) e os cremes (entre 8 e 9% de inibição; Figura 3.15b). No entanto, quanto à captura do radical ABTS^{•+} nos cremes de amêndoa (Figura 3.15a), observou-se um aumento considerável da capacidade antioxidante face ao resíduo de amêndoa (Figura 3.2a). Os vários cremes de amêndoa possuem uma inibição entre 37 e 45% relativamente à captura do radical ABTS^{•+}. Este aumento poderá eventualmente dever-se ao sumo de limão utilizado na receita dos cremes, já que este fruto se trata de um antioxidante natural reconhecido, possuindo uma capacidade de captura do radical ABTS^{•+} de 145,8±13,7 mg de vitamina C equivalente/100 g (Floegel *et al.*, 2011).

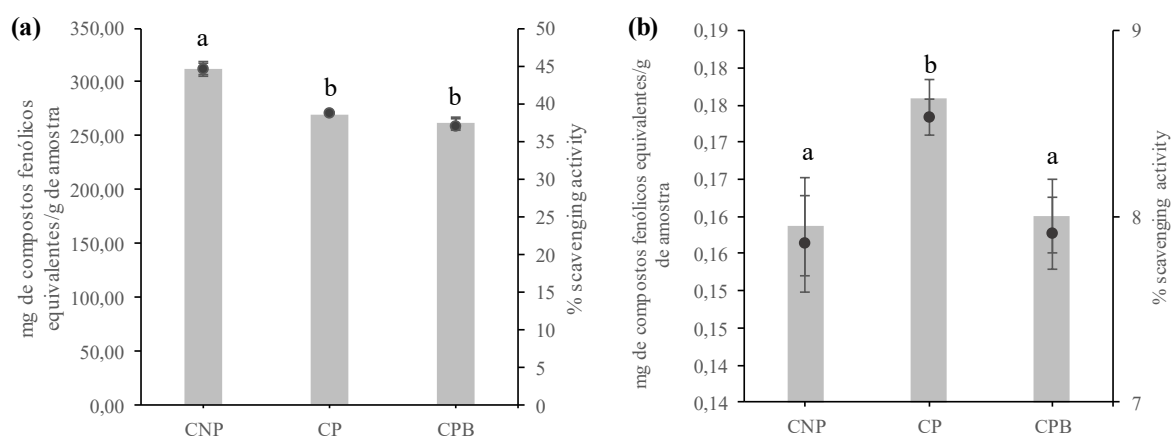


Figura 3.15 Concentração equivalente de compostos fenólicos (■) e percentagem de inibição (●) relativas à captura do radical do radical ABTS^{•+} (a) e à captura do radical DPPH (b) em cremes de barrar não pasteurizado (CNP), pasteurizado (CP) e pasteurizado probiótico (CPP) após produção. Para cada amostra, valores com a mesma letra subscrita não demonstram diferença significativa ($p < 0,05$).

3.5.3.2. Atividade antidiabética

No que respeita à atividade antidiabética, esta foi menor em todos os cremes (Figura 3.16) por comparação com o da acarbose que foi de 88 %. Não se observou diferenças significativas nos valores de inibição da enzima α -glucosidase ($p > 0,05$) entre os três cremes de amêndoa para barrar, o que era esperado, já que também não se observam diferenças no teor de açúcares totais entre eles. A inibição (%) da α -glucosidase registada variou entre 16 e 19 %, valores próximos do obtido com a matéria-prima resíduo de amêndoa (13 %) (Figura 3.3). De acordo com o meu conhecimento não existem trabalhos semelhantes na literatura pelo que não é possível uma discussão comparável dos resultados obtidos.

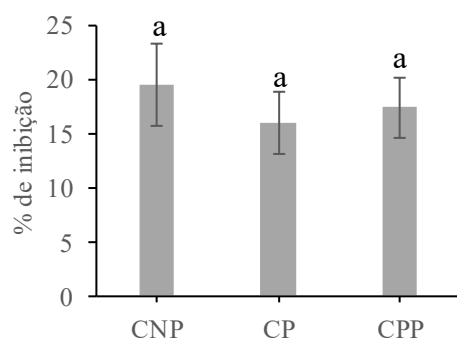


Figura 3.16. Inibição (%) da α -glucosidase determinada nos cremes de amêndoa de barrar não pasteurizado (CNP), pasteurizado (CP) e pasteurizado probiótico (CPP) (0 dias).

3.5.4. Análise sensorial

Tendo em conta os resultados obtidos no que refere à aceitação (Tabela 3.7), quer o creme de amêndoa para barrar CP, quer o CPP foram bem aceites pelos provadores, embora o primeiro tenha tido um maior número de avaliações positivas do que o segundo. No CPP apenas 3 % dos avaliadores se mostraram indiferentes. A intenção de compra também se mostrou positiva para os dois produtos, embora a do creme CP tenha sido ligeiramente superior à do creme CPP.

Relativamente à intensidade (1 Desgosto extremamente – 9 Gosto extremamente) dos atributos aspeto, odor, sabor, cremosidade, consistência e adstringência, todos se mostraram positivos (>5) para os dois cremes de amêndoa analisados. As únicas diferenças registadas prendem-se com os atributos sabor e consistência em que no primeiro atributo, a maioria dos inquiridos preferiu o CP, ao passo que no segundo, a maioria dos inquiridos preferiu o CPP.

Tabela 3.7. Aceitação e intenção de compra do consumidor (média±desvio-padrão) e intensidade dos atributos aspeto, odor, sabor, cremosidade, consistência e adstringência dos cremes de barrar pasteurizado (CP) e pasteurizado probiótico (CPP).

Análise sensorial	CP	CPP
Aceitação do consumidor	6,7±1,6	6,7±1,5
Avaliação positiva	90%	83%
Avaliação negativa	10%	13%
Avaliação indiferente	0%	3%
Intenção de compra	6,4±3,2	6,0±3,0
	Intensidade dos atributos	
Aspeto	0,7	0,7
Odor	0,8	0,8
Sabor	0,8	0,7
Cremosidade	0,8	0,8
Consistência	0,6	0,7
Adstringência	0,7	0,7

Aceitação do consumidor e intenção de compra: média com intervalo de valores entre 1 e 11; Intensidade dos atributos: valores expressos por frequência (0-1)

4. Conclusões gerais

Da caracterização microbiológica, química e biológica da bebida e coprodutos da amêndoa, é possível concluir que:

- A bebida e os coprodutos da amêndoa apresentaram um pH ligeiramente ácido (entre 5,17 e 6,63) correlacionável com a acidez titulável e não evidenciaram contaminações por *S. aureus* e enterococos em nenhum dos seis lotes analisados; só foi detetada a presença de bactérias lácticas em dois lotes. A presença de enterobactérias até valores superiores a 10^5 UFC/mL encontrada na maioria dos lotes constitui um resultado não satisfatório. É de notar a existência de alguma heterogeneidade no que respeita ao número de células viáveis entre as amostras dos diferentes lotes.
- O resíduo de amêndoa apresentou maior teor de acidez titulável (0,63 %), açúcares totais (186 mg/g), proteínas totais (358 mg/g) e ácidos gordos totais (529 µg/mg), do que a bebida e o soro de amêndoa, sendo, por isso dos três o mais rico em nutrientes. A hidrólise do resíduo com Viscozyme L levou a um aumento significativo do teor de açúcares totais em cerca de 68 %; A bebida de amêndoa e os coprodutos apresentam perfis de ácidos gordos livres e esterificados diversificados, destacando-se ácido palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico e linoleico que também fazem parte da composição do miolo da amêndoa, com destaque para os ácidos oleico e linoleico;
- Os valores mais elevados no que se refere à capacidade de captura do radical ABTS^{•+} são observados no resíduo de amêndoa hidrolisado com viscozyme L, i.e., 21 vezes superiores aos do resíduo não hidrolisado e 5 vezes superiores aos da bebida e do soro. No que se refere a valores de captura do radical DPPH, o maior potencial é observado no soro de amêndoa, i.e., 3 vezes superior à bebida e ao resíduo (hidrolisado e não hidrolisado);
- Relativamente à atividade antidiabética, valores entre 10-30% são observados para a bebida e coprodutos derivados da amêndoa;
- Todas as matrizes de amêndoa analisadas evidenciaram atividade prebiótica, porém o soro de amêndoa, o resíduo de amêndoa a 4 % (m/v) e o resíduo de amêndoa hidrolisado a 2 % (m/v), revelaram ser as melhores fontes alternativas de carbono para crescimento de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12. O soro de amêndoa promoveu um crescimento exponencial mais acelerado de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12. O crescimento de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 foi influenciado positivamente pela hidrólise prévia do resíduo de amêndoa e pelo aumento da concentração de resíduo.

No que diz respeito à formulação, produção e caracterização de bebidas fermentadas, à base de soro ou mistura com bebida de amêndoa, e de cremes de barrar à base de resíduo de amêndoa, é possível concluir que:

- Foi possível preparar bebidas fermentadas probióticas à base de soro de amêndoa (BSF) e à base de mistura de soro com bebida de amêndoa (BMF), nas quais *S. thermophilus* alcançou 7 log UFC/mL mais rapidamente do que *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (no final da fermentação vs período de armazenamento, respectivamente). A fermentação da BSF e BMF ocorre num período mínimo de 3,5 e 4,5 h, respectivamente, para se atingir um pH final de aproximadamente 4,5;
- Como consequência da fermentação, estas matrizes apresentaram maior teor de acidez titulável, menor teor de açúcares totais e maior teor de proteína total (9-17 vezes superior), do que os encontrados nas matérias-primas de origem;
- A fermentação não teve influência na capacidade de captura do radical ABTS^{•+}, mas levou a uma perda de capacidade de captura do radical DPPH relativamente ao que foi observado nas matérias-primas (2-3 vezes inferior). Já no que diz respeito à atividade antidiabética, o processo fermentativo e o respetivo armazenamento parecem ter contribuído para uma diminuição da mesma.
- O tratamento térmico por pasteurização efetuado nos cremes para barrar não foi totalmente eficaz na eliminação de leveduras, bactérias lácticas e mesófilos e psicrófilos totais presentes originalmente na matéria-prima, no entanto não se verificou a presença de enterobactérias e bolores nos cremes que foram sujeitos ao tratamento térmico. No creme CPP, durante os 14 dias de armazenamento sobre refrigeração, o número de células viáveis de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 manteve-se estável e dentro da ordem de grandeza de 10⁷ UFC/g necessária para promover um efeito probiótico;
- Ao longo do período de armazenamento, o crescimento de bactérias lácticas nos três cremes e de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 no CPP contribuiu para uma diminuição do pH acompanhada por um aumento da acidez titulável;
- A pasteurização dos cremes CP e CPP não teve qualquer influência no teor de açúcares e proteínas totais; O creme CP para além de possuir um perfil de ácidos gordos equivalente ao presente na amêndoa, também possui grande concentração de ácido láurico e mirístico atribuída ao óleo de coco utilizado na sua formulação;
- A atividade antidiabética não difere entre os três cremes para barrar, sendo equivalente à do resíduo de amêndoa. Não se observam diferenças entre a capacidade de captura do radical

DPPH entre o resíduo de amêndoa e os cremes, no entanto, quanto observou-se um aumento da capacidade de captura do radical ABTS^{•+} face ao resíduo;

-Quer o CP, quer o CPP foram bem aceites pelos provadores e a intenção de compra e intensidade dos atributos avaliados também se mostrou positiva nos dois.

5. Trabalho futuro

Este trabalho gerou resultados promissores que indicam o potencial valor acrescentado da bebida de amêndoa e dos coprodutos (soro e resíduo de amêndoa) valorizando a sua exploração e estudo adicional. Ainda existe muito trabalho pela frente, pois a bibliografia existente sobre o assunto ainda é muito escassa. No sentido de complementar o trabalho que foi feito, é determinante continuar a sua caracterização em termos nutricionais e químicos e melhorar os produtos que foram desenvolvidos. Os produtos desenvolvidos neste trabalho apresentam bastante potencial, mas ainda se encontram em fase experimental, necessitando de melhorias ao nível das suas características organolépticas e sensoriais, além de procedimentos que garantam a estabilidade da qualidade microbiológica e físico-química ao longo do prazo de validade. Também é sugerido o desenvolvimento de outros novos produtos entre os quais bolachas, biscoitos, bolos, pão, *smoothies*, etc; diferentes tipologias e com diferentes combinações de frações e culturas microbianas. Para além disso, será interessante perceber se estes ingredientes derivados da amêndoa podem trazer mais benefícios para a saúde ao serem incorporados como ingredientes funcionais avaliando-se mais propriedades biológicas como por exemplo: atividades anti-hipertensiva, anti-tumoral, anti-microbiana, imunoreguladora, entre outras.

6. Anexos

6.1. Composição comercial do meio de cultura *Streptococcus thermophilus* Isolation Agar (STIA).

Tabela 6.1. Composição comercial do meio de cultura *Streptococcus thermophilus* Isolation Agar (STIA).

Ingredientes	Concentração (g/L)
Hidrolizado enzimático de caseína	10.0
Extrato de levedura	5.0
Sacarose	10.0
Fosfato di-potássio	2.0
Agar	15.0

pH final: 6.8±0.2 a 25°C;

Retirado de <http://www.himedialabs.com/TD/M948.pdf>.

7. Apêndices

7.1. Curva de calibração do método Fenol-Ácido-Sulfúrico

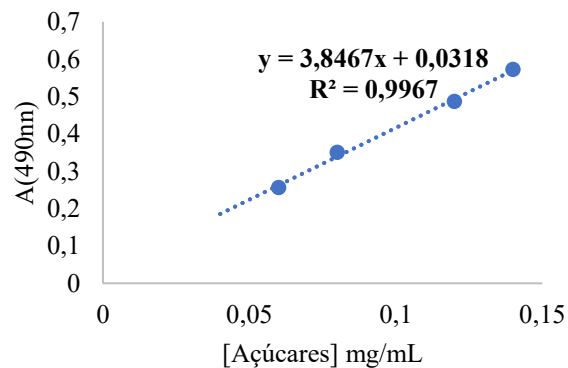


Figura 7.1. Curva de calibração obtida usando a glucose como padrão para calcular os valores de açúcar no método Fenol-Ácido-Sulfúrico.

7.2. Curva de calibração do método Proteínas BCA

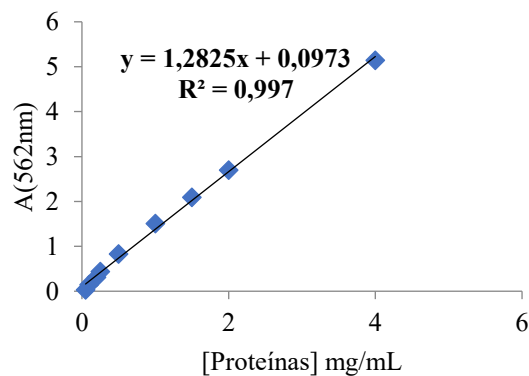


Figura 7.2. Curva de calibração obtida usando o ácido ascórbico como padrão para calcular os valores no método de BCA.

7.3. Curva de calibração do método ABTS⁺

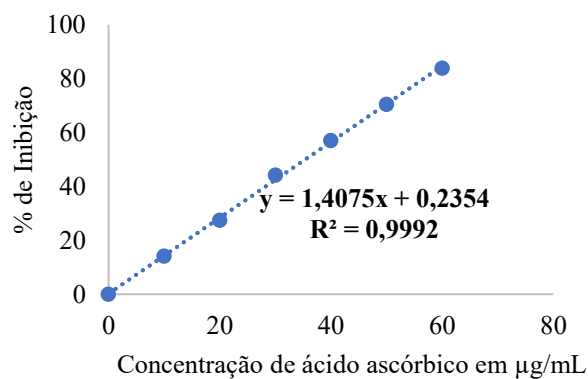


Figura 7.3. Curva de calibração obtida usando o ácido ascórbico como padrão para calcular os valores no método de ABTS⁺.

7.4. Curva de calibração do método DPPH

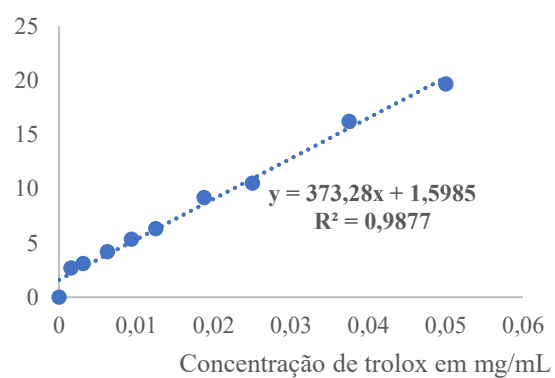


Figura 7.4. Curva de calibração obtida usando o ácido ascórbico como padrão para calcular os valores no método de DPPH.

7.5. Questionário de análise sensorial

Prova de Análise Sensorial – Creme de amêndoa para barrar

Por favor preencha o questionário seguinte:

Idade: _____

Sexo: F M

Profissão:

Quadro Superior/ Técnico Superior

Quadro Médio Técnico

Auxiliar

Desempregado

Estudante universitário

_____ (outro)

Com que frequência consome “cremes para barrar”?

Diariamente

Semanalmente

Mensalmente

Algumas vezes por ano

Muito raramente

Nunca

Por favor, prove as duas amostras pela ordem indicada e assinale a sua apreciação em cada amostra com um X, relativamente aos parâmetros: Aspeto, Odor, Sabor, Cremosidade, Consistência, Adstringência e Apreciação global e deixe o seu respetivo comentário. Entre cada prova beba um pouco de água

Creme de amêndoa I

	Desgosto extremamente	Desgosto muito	Desgosto moderadamente	Desgosto ligeiramente	Não gosto nem desgosto	Gosto ligeiramente	Gosto moderadamente	Gosto muito	Gosto extremamente
Aspeto									
Odor									
Sabor									
Cremosidade									
Consistência									
Adstringência									
Apreciação Global									

Comentário (OBRIGATÓRIO):

Q1. Consumiria este creme, se estivesse disponível no mercado a um preço conveniente?

- | | |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Possibilidade razoável |
| <input type="checkbox"/> É quase certo | <input type="checkbox"/> Alguma possibilidade |
| <input type="checkbox"/> Muito provavelmente | <input type="checkbox"/> Possibilidade ligeira |
| <input type="checkbox"/> Provavelmente | <input type="checkbox"/> Possibilidade muito ligeira |
| <input type="checkbox"/> Boa possibilidade | <input type="checkbox"/> Não |
| <input type="checkbox"/> Possibilidade média | |

Por favor prove agora o creme II.

Creme de amêndoa II

	Desgosto extremamente	Desgosto muito	Desgosto moderadamente	Desgosto ligeiramente	Não gosto nem desgosto	Gosto ligeiramente	Gosto moderadamente	Gosto muito	Gosto extremamente
Aspetto									
Odor									
Sabor									
Creiosidade									
Consistência									
Adstringência									
Apreciação Global									

Comentário (OBRIGATÓRIO):

Q2. Consumiria este creme, se estivesse disponível no mercado a um preço conveniente?

- | | |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Possibilidade razoável |
| <input type="checkbox"/> É quase certo | <input type="checkbox"/> Alguma possibilidade |
| <input type="checkbox"/> Muito provavelmente | <input type="checkbox"/> Possibilidade ligeira |
| <input type="checkbox"/> Provavelmente | <input type="checkbox"/> Possibilidade muito ligeira |
| <input type="checkbox"/> Boa possibilidade | <input type="checkbox"/> Não |
| <input type="checkbox"/> Possibilidade média | |

Q3. Em geral, quanto gosta dos produtos abaixo indicados?

	Desgosto extremamente	Desgosto muito	Desgosto moderadamente	Desgosto ligeiramente	Não gosto nem desgosto	Gosto ligeiramente	Gosto moderadamente	Gosto muito	Gosto extremamente
Creme I									
Creme II									

Muito obrigada pela vossa colaboração!

8. Bibliografia

- Asegaonkar, S. B., Marathe, A., Tekade, M. L., Cherekar, L., Bavikar, J., Bardapurkar, J., & Ajay, R. 2011. High-sensitivity C-reactive protein: a novel cardiovascular risk predictor in type 2 diabetics with normal lipid profile. *Journal of Diabetes and its Complications*, 25(6), 368-370.
- Aydin, C. 2003. Physical properties of almond nut and kernel. *Journal of Food Engineering*, 60(3), 315-320.
- (AACC) American Association of Cereal Chemists. 2001. The definition of dietary fiber. (Report of the Dietary Fiber Definition Committee to the Board of Directors of the AACC.). *Cereal Foods World* 46 (3), 112–126.
- Alasalvar, C., & Shahidi, F. (Eds.). 2008. *Tree nuts: composition, phytochemicals, and health effects*. CRC Press.
- Bachmann, P-H. 2001) Cheese analogues: a review. *International Dairy Journal*, 505-515.
- Badem, A. and Uçar, G. 2016. Cheese Analogues. Research & Reviews: *Journal of Food and Dairy Technology*
- Bansal, S., Mangal, M., Sharma, S. K., & Gupta, R. K. 2016. Non-dairy based probiotics: A healthy treat for intestine. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(11), 1856-1867.
- Bennett, H. W., Jaceldo, K. B., & Sabaté, J. 2002. Effect on body weight of a free 76 kilojoule (320 calorie) daily supplement of almonds for six months. *Journal of the American College of Nutrition*, 21(3), 275-283.
- Blomhoff, R., Carlsen, M. H., Andersen, L. F., & Jacobs, D. R. 2006. Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. *British Journal of Nutrition*, 96(S2), S52-S60.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. *LWT-Food Science and Technology*, 30(6), 609-615.
- Brigelius-Flohe', R., Kelly, F.J., Salonen, J.T., Neuzil, J., Zingg, J.-M., Azzi, A. 2002. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *American Journal of Clinical Nutrition* 76, 703–716.

- Capurso A., Crepaldi G., Capurso C. 2018. Nuts. In: Benefits of the Mediterranean Diet in the Elderly Patient. Practical Issues in Geriatrics. Springer, Cham
- Cassady, B. A., Hollis, J. H., Fulford, A. D., Considine, R. V., & Mattes, R. D. 2009. Mastication of almonds: effects of lipid bioaccessibility, appetite, and hormone response. *The American journal of clinical nutrition*, 89(3), 794-800.
- Chavan, R. S. and Jana, A. 2007. Cheese substitutes: an alternative to natural cheese – a review. *Int. J. of Food Science, Technology and Nutrition*, 25-39.
- Chen, C.Y, Milbury, P.E, Lapsley, K., Blumberg, J.B. 2005. Flavonoids from almond skins are bioavailable and act synergistically with vitamins C and E to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. *J Nutr.* 2005;135:1366–1373..
- Chen, C. Y., Lapsley, K., & Blumberg, J. 2006. A nutrition and health perspective on almonds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(14), 2245-2250.
- Chen, P., Yanling, C., Shaobo, D., Xiangyang, L., Guangwei, H., & Ruan, R. 2010. Utilization of almond residues. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 3(4), 1-18.
- Cheplick, S., Kwon, Y. I., Bhowmik, P., & Shetty, K. 2010. Phenolic-linked variation in strawberry cultivars for potential dietary management of hyperglycemia and related complications of hypertension. *Bioresource Technology*, 101(1), 404-413.
- Chiu, H.H., Tsai, C.C., Hsieh, H.Y., Tsen, H.Y. 2007. Screening from pickled vegetables the potential probiotic strains of lactic acid bacteria able to inhibit the Salmonella invasion in mice. *J. Appl. Microbiol.* 104, 605–612.
- ChubbyVegan. 2013. Leite de amêndoas. Disponível: <https://chubbyvegan.net/receitas/leite-de-amendoas/> [data da consulta: 9/11/2018].
- Cifelli, C. J., Houchins, J. A., Demmer, E., & Fulgoni, V. L. 2016. Increasing plant based foods or dairy foods differentially affects nutrient intakes: Dietary scenarios using NHANES 2007–2010. *Nutrients*, 8(7), 422.
- Cleveland, D. A., & Gee, Q. 2017. Plant-based diets for mitigating climate change. In *Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Prevention* (pp. 135-156).

Correia, P., Leitão, A., & Beirão-da-Costa, M. L. 2008. The effect of drying temperatures on morphological and chemical properties of dried chestnuts flours. *Journal of Food Engineering*, 90(3), 325-332.

Parlamento Europeu e Conselho da UE 2013. Regulamento (UE) nº 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho de 17 de dezembro de 2013 que estabelece uma organização comum dos mercados dos produtos agrícolas e que revoga os Regulamentos (CEE) n.º 922/72, (CEE) n.º 234/79, (CE) n.º 103797/2001, (CE) n.º 1234/2007 do Conselho.

Conway, P. L. 1996. Selection criteria for probiotics microorganisms. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 5, 10–14.

DebMandal, M., & Mandal, S. 2011. Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): in health promotion and disease prevention. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(3), 241-247.

Diarra, K., Nong, Z. G. and Jie, C. 2005. Peanut milk and peanut milk-based products production: A review. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 45:405–423.

Dourado, F., Barros, A., Mota, M., Coimbra, M. A., & Gama, F. M. 2004. Anatomy and cell wall polysaccharides of almond (*Prunus dulcis* DA Webb) seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(5), 1364-1370.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.

Ebiosis. 2002. Folha do produto Viscozyme® L. Disponível: <http://www.ebiosis.co.kr/Novozymes%20Product%20Sheet/Viscozyme%20L.pdf> [data de consulta: 2/10/2018].

Ellis, P. R., Kendall, C. W., Ren, Y., Parker, C., Pacy, J. F., Waldron, K. W., & Jenkins, D. J. (2004). Role of cell walls in the bioaccessibility of lipids in almond seeds. *The American journal of clinical nutrition*, 80(3), 604-613.

England, N. H. S. 2016. The eatwell guide - Live well - NHS choices. Retirado de <http://www.nhs.uk/Livewell/Goodfood/Pages/the-eatwell-guide.aspx>

Flo and grace. 2011. Gluten-free almond pulp crackers. Disponível: https://www.floandgrace.com/201189gluten-free-almond-pulp-crackers-winners.html/?utm_medium=yummly&utm_source=yummly&utm_campaign=yummly [data de consulta: 8/11/2018]

- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of food composition and analysis*, 24(7), 1043-1048.
- Food and Agriculture Organization (FAO). Almond production. Disponível: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> [data de consulta: 19/02/2018].
- Forum for the Future 2016. The future of protein - The Protein Challenge 2040: Shaping the future of food40.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. 2000. Fundamentals of cheese science.
- Fox, P. F., McSweeney, P. L.M., Cogan, T.M. and Guinee, T.P. 2004. Major Cheese Groups; *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Volume 2, Pages 1-434.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. 2017. Fundamentals of cheese science (2nd ed.). New York: Springer 589–628 (Capítulos 17 e 18). Fraser, G. E., Gervajio, G. C. 2000. Fatty acids and derivatives from coconut oil. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 1-38.
- Gião, M. S., Gonzalez-Sanjose, M. L., Rivero-Perez, M. D., Pereira, C. I., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. 2007. Infusions of portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 87(14), 2638-2647.
- Gilad, O., Svensson, B., Viborg, A. H., Stuer-Lauridsen, B., & Jacobsen, S. 2011. The extracellular proteome of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 reveals proteins with putative roles in probiotic effects. *Proteomics*, 11(12), 2503-2514.
- Gilmore, M. 2015. *Everyday detox: 100 easy recipes to remove toxins, promote gut health, and lose weight naturally*. Ten Speed Press.
- Global Almond milk market report 2016-2020. Disponível: <https://www.bioportfolio.co.uk/productpdf.php?params=23593> [data de consulta 10/10/2018].
- Gomes, A.M.P., Andrade, J.C., Freitas A.C. 2017. The use of probiotics in the food industry. In *Strategies for obtaining healthier foods*. José ML Rodríguez & Francisco JC García (Eds). Food Science and Technology, Nova Science Publishers Inc. New York, USA. 395 Pages (129-182).

- Gomes, A. M., & Malcata, F. X. 1999. Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10(4-5), 139-157.
- Granato, D., & Ellendersen, L. D. S. N. 2009. Almond and peanut flours supplemented with iron as potential ingredients to develop gluten-free cookies. *Food Science and Technology*, 29(2), 395-400.
- Granato, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Cruz, A. G., & Faria, J. A. 2010. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9(3), 292-302.
- Grundy, M. M., Wilde, P. J., Butterworth, P. J., Gray, R., & Ellis, P. R. 2015. Impact of cell wall encapsulation of almonds on in vitro duodenal lipolysis. *Food chemistry*, 185, 405-412.
- Homespun capers. 2016. Almond hummus (raw nut pulp hummus). Disponível: em <http://homespun-capers.com/2016/01/09/almond-hummus-raw-nut-pulp-hummus/> [data de consulta: 8/10/2018].
- Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y. C., Choi, I., & Kim, G. B. 2014. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food chemistry*, 160, 346-356.
- Hyson, D. A.; Schneeman, B. O.; Davis, P. A. 2002. Almonds and almond oil have similar effects on plasma lipids and LDL oxidation in healthy men and women. *J. Nutr.*, 132 (4), 703–707.
- INSA. 2018. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Tabela de composição de alimentos. Disponível: <http://portfir.insa.pt/foodcomp/search?searchString=farinha&comparisonOperator=0>. [data de consulta: 12/02/2018].
- Jain, N., Sethi, J. R., & Rajvanshi, A. C. 2018. Toxicity of Amygdalin: A Significant and Emphasizing Facet of Study in Forensic Toxicology. *Editorial Board*, 18.
- Jenkins, D.J.A., C.W.C. Kendall, A. Marchie, T.L. Parker, P.W. Connelly, W. Qian. 2002. “Dose response of almonds on coronary heart disease risk factors – blood lipids, oxidized LDL, Lp(a), homocysteine and pulmonary nitric oxide: A randomized controlled cross-over trial,” *Circulation*, 106, 1327–1332.
- Jeske, S., Zannini, E., & Arendt, E. K. 2017. Past, present and future: The strength of plant-based dairy substitutes based on gluten-free raw materials. *Food Research International*.

- Jeswani, H. K., Burkinshaw, R., & Azapagic, A. 2015. Environmental sustainability issues in the food – Energy –Water nexus: Breakfast cereals and snacks. *Sustainable production and consumption*. 2. (pp. 17–28).
- Kabara, J. J. 2000. Health oils from the tree of life. Nutritional and Health Aspects of Coconut Oil). *Indian Coconut Journal*, 31(8), 2-8.
- Kalita, S., Khandelwal, S., Madan, J., Pandya, H., Sesikeran, B., & Krishnaswamy, K. 2018. Almonds and Cardiovascular Health: A Review. *Nutrients*, 10(4), 468.
- Kamil, A., & Chen, C. Y. O. 2012. Health benefits of almonds beyond cholesterol reduction. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(27), 6694-6702.
- Kendall, C. W., Josse, A. R., Esfahani, A., & Jenkins, D. J. 2010. Nuts, metabolic syndrome and diabetes. *British journal of nutrition*, 104(4), 465-473.
- Kendall, C. W., Esfahani, A., Truan, J., Srichaikul, K., & Jenkins, D. J. 2010. Health benefits of nuts in prevention and management of diabetes. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 19(1), 110-116.
- Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S., & Appel, L. J. 2003. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(2), 151-152.
- Kodad, O., & Socias i Company, R. 2008. Variability of oil content and of major fatty acid composition in almond (*Prunus amygdalus* Batsch) and its relationship with kernel quality. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(11), 4096-4101.
- Kundu, P., Dhankhar, J., & Sharma, A. 2018. Development of Non Dairy Milk Alternative Using Soymilk and Almond Milk. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 6(1), 203-210.
- Kwon, Y. I., Apostolidis, E., & Shetty, K. 2008. In vitro studies of eggplant (*Solanum melongena*) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. *Bioresource Technology*, 99, 2981–2988.
- Lin, S., Tian, W., Li, H., Cao, J., & Jiang, W. 2012. Improving antioxidant activities of whey protein hydrolysates obtained by thermal preheat treatment of pepsin, trypsin, alcalase and flavourzyme. *International journal of food science & technology*, 47(10), 2045-2051.
- Liu, Z., Lin, X., Huang, G., Zhang, W., Rao, P., & Ni, L. 2014. Prebiotic effects of almonds and almond skins on intestinal microbiota in healthy adult humans. *Anaerobe*, 26, 1-6.

Low tox life. 2014. 5 ideas to use up your leftover almond pulp. Disponível: <https://www.lowtoxlife.com/5-ideas-to-use-up-your-leftover-almond-pulp/> [data de consulta: 10/10/2018]

Lucey, J. A. 2002. Formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science*, 85(2), 281–294.

Mäkinen, O. E., Wanhalinna, V., Zannini, E., & Arendt, E. K. 2016. Foods for special dietary needs: Non-dairy plant-based milk substitutes and fermented dairy-type products. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(3), 339-349.

^aMandalari, G., Tomaino, A., Arcoraci, T., Martorana, M., Turco, V. L., Cacciola, F., ... & Cross, K. L. 2010. Characterization of polyphenols, lipids and dietary fibre from almond skins (*Amygdalus communis* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(2), 166-174.

^bMandalari, G., Faulks, R. M., Bisignano, C., Waldron, K. W., Narbad, A., & Wickham, M. S. 2010. In vitro evaluation of the prebiotic properties of almond skins (*Amygdalus communis* L.). *FEMS microbiology letters*, 304(2), 116-122. ISO 690.

Marshall, J. W., Lapsley, M., Day, P.A., Ayling, M. R. 2017. *Bioquímica Clínica: Aspectos Clínicos e Metabólicos*.

Martínez-Gómez, P., Sánchez-Pérez, R., & Dicenta, F. 2008. Fruit development in almond for fresh consumption. *Journal-American Pomological Society*, 62(2), 82.

Martins, I. M., Chen, Q., & Chen, C. Y. 2017. Emerging Functional Foods Derived from Almonds. *Wild Plants, Mushrooms and Nuts: Functional Food Properties and Applications*, 445-469.

Masotti, F., Cattaneo, S., Stuknytè, M., & De Noni, I. 2018. Status and developments in analogue cheese formulations and functionalities. *Trends in Food Science & Technology*.

Miles, A. A., & Misra, S. S. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene*, 38:732-749.

Mulsow, B. B., Jaros, D., & Rohm, H. 2007. Processed cheese and cheese analogues. *Structure of dairy products*, 1, 210-235.

Naruszewicz M, Johansson ML, Zapolska-Downar D, Bukowska H. 2002. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. *Am J Clin Nutr* 76:1249–1255

- Oi, Y., & Kitabatake, N. 2003. Chemical composition of an East African traditional beverage, togwa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7024–7028.
- Orsavova, J., Misurcova, L., Ambrozova, J. V., Vicha, R., & Mlcek, J. 2015. Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. *International journal of molecular sciences*, 16(6), 12871-12890.
- Pascual-Albero, M. J., Perez-Munuera, I., & Lluch, M. A. 1998. Cotyledon structure of raw, soaked and roasted almond (*Prunus amygdalus* L.). *Food Science and Technology International*, 4(3), 189-197.
- Petschow, B. W., Batema, R. P., & Ford, L. L. 1996. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to bactericidal properties of medium-chain monoglycerides and free fatty acids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(2), 302-306.
- Pimentel, D., Pimentel, M. 2003. Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. *The American journal of clinical nutrition*, 78(3), 660S-663S.
- Pimentel, L.L., Fontes, A.L., Gomes, A.M.P. & Rodríguez-Alcalá, L. 2015. Considerations about the *in situ* derivatization and fractionation of EFA and NEFA in biological and food samples. *MethodsX*, 2: 475-484.
- Prado, F. C., Parada, J. L., Pandey, A., & Soccol, C. R. 2008. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, 41(2), 111-123.
- Prgomet, I., Gonçalves, B., Domínguez-Perles, R., Pascual-Seva, N., & Barros, A. I. 2017. Valorization Challenges to Almond Residues: Phytochemical Composition and Functional Application. *Molecules*, 22(10), 1774.
- PROTEIN2FOOD 2015. Protein2Food – Pioneering crops for future generations. Disponível: <http://www.protein2food.eu> [data de consulta: 2/02/2018]
- Rabobank. 2018. Dare Not to Dairy – What rise of dairy free means for dairy ... and How the Industry Can Respond. Disponível: <https://services.rabobank.com/publication-service/download/publication/token/tRjL6VMr6xT TT5eFd6m0> [data de consulta: 6/10/2018].
- Reid, G. 2016. Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(1), 17-25.

- Rizzo, N. S., Sabaté, J., Jaceldo-Siegl, K., & Fraser, G. E. 2011. Vegetarian dietary patterns are associated with a lower risk of metabolic syndrome. *Diabetes care*, 34(5), 1225-1227.
- Rosengarten Jr, F. 2004. *The book of edible nuts*. Courier Corporation.
- Rosset, M., Prudencio, S. H., & Beléia, A. D. P. 2012. Viscozyme L action on soy slurry affects carbohydrates and antioxidant properties of silken tofu. *Food Science and Technology International*, 18(6), 531-538.
- Sabaté, J., Haddad, E., Tanzman, J. S., Jambazian, P., & Rajaram, S. 2003. Serum lipid response to the graduated enrichment of a Step I diet with almonds: a randomized feeding trial. *The American journal of clinical nutrition*, 77(6), 1379-1384.
- Sabaté, J., & Soret, S. 2014. Sustainability of plant-based diets: back to the future. *The American journal of clinical nutrition*, 100(Supplement 1), 476S-482S.
- Sanders, M., Huis in't Veld, J. 1999. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 293–315.
- Saura-Calixto, F., Canellas, J., & Garcia-Raso, J. 1983. Contents of detergent-extracted dietary fibers and composition of hulls, sheels, and teguments of almonds (*Prunus amygdalus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(6), 1255-1259.
- Sen, C.K., Khanna, S., Roy, S. 2007. Tocotrienols in health and disease: the other half of the natural vitamin E family. *Molecular Aspects of Medicine* 28, 692–728.
- Serhan, C. N., Chiang, N., & Van Dyke, T. E. 2008. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews Immunology*, 8(5), 349.
- Sethi, S., Tyagi, S. K., & Anurag, R. K. 2016. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. *Journal of food science and technology*, 53(9), 3408-3423.
- Shah, N.P. 2001. Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technol.* 55, 46–53.
- Singhal, S., Baker, R. D., & Baker, S. S. 2017. A Comparison of the Nutritional Value of Cow's Milk and Nondairy Beverages. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 64(5), 799-805.

- Sonesson, U., Davis, J. and Ziegler, F. 2010. Food Production and Emissions of Greenhouse Gases: An Overview of the Climate Impact of Different Product Groups. SIK Report No. 802 2010, Swedish Institute for Food and Biotechnology, Sweden.
- Songisepp E, Kals J, Kullisaar T, Mändar R, Hütt P, Zilmer M, Mikelsaar M. 2005. Evaluation of the functional efficacy of an antioxidative probiotic in healthy volunteers. *Nutr J* 4:22. doi:10.1186/1475-2891-4-22
- Spiller, G.A. and A. Miller. 2003. “Effects of plant-based diets high in raw or roasted almonds or roasted almond butter on serum lipoproteins in humans,” *J. of the American College of Nutrition*, 22,195–200.
- Spiller, G. A.; Jenkins, D. A. J.; Bosello, O.; Gates, J. E.; Cragen, L. N.; Bruce, B.1998. Nuts and plasma lipids: an almond-based diet lowers LDL-C while preserving HDL-C. *J. Am. Coll. Nutr.*, 17 (3), 285–290.
- Stall, S., & Adams, G. 2017. Can Almond Milk Be Called Milk?. *Journal of Renal Nutrition*, 27(3), e15-e17.
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V. and de Haan, C. 2006. *Livestock’s Long Shadow: Environmental Issues and Options*. FAO, Rome, Italy.
- Stewart H., Dong D., Carlson A. 2013. Why Are Americans Consuming Less Fluid Milk? A Look at Generational Differences in Intake Frequency. <https://www.ers.usda.gov/publications/pub-details/?pubid=45075>. Acessado em junho de 2018.
- Swanson, D., Block, R., & Mousa, S. A. 2012. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. *Advances in nutrition*, 3(1), 1-7.
- Sweazea, K. L., Johnston, C. S., Ricklefs, K. D., & Petersen, K. N. 2014. Almond supplementation in the absence of dietary advice significantly reduces C-reactive protein in subjects with type 2 diabetes. *Journal of Functional Foods*, 10, 252-259.
- Tamime, A. Y. 2011. Processed cheese and analogues: An overview. *Processed cheese and analogues*, 1-24.
- Tetens, I. 2011. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA); Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre.

The rising spoon. 2013. What to do with leftover almond pulp? Disponível: <https://www.therisingspoon.com/2013/09/what-to-do-with-leftover-almond-pulp.html> [data de consulta 10/10/2018].

The raw food mum. 2013. Raw bread recipe. Disponível: http://www.therawfoodmum.com/tom_recipes/raw-bread-recipe-that-will-change-the-way-you-eat-bread/ [data de consulta 10/10/2018].

The uniplanet. 2017. O que fazer com o resíduo dos leites vegetais? Disponível: <https://www.theuniplanet.com/2017/01/o-que-fazer-com-o-residuo-dos-leites.html?m=0> [data de consulta 10/10/2018].

Trading waste for abundance. 2015. Making almond flour from leftover almond pulp! Disponível: <http://tradingwasteforabundance.com/blog/2015/6/17/homemade-gluten-free-banana-bread-with-leftover-almond-pulp> [data de consulta 10/10/2018].

(USDA) United States Department of Agriculture. National Nutrient Database for Standard Reference Legacy Release. Disponível: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/12061?fgcd=&manu=&format=&count=&max=25&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=12061&ds=&qt=&qp=&qa=&qn=&q=&ing=> [data de consulta 22/07/2018].

Vanga, S. K., & Raghavan, V. 2017. How well do plant based alternatives fare nutritionally compared to cow's milk?. *Journal of food science and technology*, 1-11

Virtanen T, Pihlanto A, Akkanen S, Korhonen H. 2007. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol* 102:106–115. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03072.x

Wahrburg, U. 2004. What are the health effects of fat?. *European journal of nutrition*, 43(1), i6-i11.

Wall, J. S.; Huebner, F. R. 1981. Adhesion and cohesion. In: *CHERRY, J. P. (Ed.). Protein Functionality in Foods. Washington: American Chemical Society.* p. 111.

Xiao, L., Lee, J., Zhang, G., Ebeler, S. E., Wickramasinghe, N., Seiber, J., & Mitchell, A. E. 2014. HS-SPME GC/MS characterization of volatiles in raw and dry-roasted almonds (*Prunus dulcis*). *Food chemistry*, 151, 31-39.

Yada, S., Lapsley, K., & Huang, G. 2011. A review of composition studies of cultivated almonds: Macronutrients and micronutrients. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(4), 469-480.

Yada, S., Huang, G., & Lapsley, K. 2013. Natural variability in the nutrient composition of California-grown almonds. *Journal of food composition and analysis*, 30(2), 80-85.

Zegler J. 2013. Dairy and Nondairy Milk—US—2013. Disponível em <http://store.mintel.com/dairy-and-non-dairy-milk-us-april-2013>. Acessado em Junho de 2018.

Zemaitis, J., & Sabaté, J. 2001. Effect of almond consumption on stool weight and stool fat. In *Faseb Journal* (Vol. 15, No. 4, pp. A602-A602).