



**Caracterização nutricional, química e bioativa do mesocarpo de  
*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng (babaçu) e aplicação da sua farinha  
em produtos de panificação e pastelaria**

**Vitória Mayumi Dos Santos Souza**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do  
Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no âmbito da dupla diplomação  
com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná*

Orientadores

**Doutora Lillian Bouçada de Barros**

**Doutora Maria Inês Moreira Figueiredo Dias**

**Professora Doutora Nádia Cristiane Steinmacher**

**Bragança**

**2021**

Agradecimento à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) e aos fundos nacionais FCT/MCTES pelo apoio financeiro ao CIMO (UIDB/00690/2020). Agradecimento também pelo programa FEDER-Interreg España-Portugal através do projeto TRANSCoLAB 0612\_TRANS\_CO\_LAB\_2\_P.



Aos meus pais, por nunca terem medido esforços,  
**dedico.**

## **Agradecimentos**

<sup>1</sup>A presente dissertação de mestrado não poderia chegar a bom porto sem o precioso apoio de várias pessoas.

Agradeço a Deus por permitir que eu tivesse saúde e determinação durante a realização deste trabalho, principalmente devido ao atual momento pandêmico que vivemos. A Ele, que fez com que meus objetivos fossem alcançados, durante todos os meus anos de estudos.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, bem como ao Instituto Politécnico de Bragança, instituições de confiança que me proporcionaram essa oportunidade e vivência única.

Aos meus pais, Mara e Gilberto, irmãs, Giulia e Raquel, e meu cunhado, Caio, por todo o apoio e pela ajuda, que muito contribuíram para que tudo se tornasse possível, por me incentivarem nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

Às pessoas com quem convivi ao longo desse ano, que certamente tiveram impacto na minha formação pessoal, acadêmica e profissional.

Às minhas orientadoras Maria Inês, Nádia e Lillian por aceitarem conduzir o meu trabalho de pesquisa e por tudo o que aprendi durante o desenvolvimento desta dissertação.

Agradeço principalmente ao Professor Alexandre Mendes da Rocha pela sua confiança inigualável, pois sem a sua contribuição esse trabalho não seria possível, e a todos que participaram, direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

À todos, meu sincero agradecimento.

---

<sup>1</sup> Texto escrito em Português do Brasil

*"Minha terra tem **palmeiras**,  
onde canta o **sabiá**;  
As aves, que aqui **gorjeiam**,  
não **gorjeiam** como lá.  
Nosso céu tem **mais estrelas**,  
Nossas várzeas têm **mais flores**,  
Nossos bosques têm **mais vida**,  
Nossa vida **mais amores**".*

*(Gonçalves Dias*

## Resumo

As plantas alimentares não convencionais (PANCs) apresentam-se como uma alternativa viável e eficiente para a substituição dos produtos alimentares que consumimos hoje em dia. A sua aplicabilidade é praticamente ilimitada devido à sua potencialidade e características nutricionais, químicas, físicas, e biológicas, mas também por não competir com outras matrizes vegetais usadas para a alimentação humana. *Attalea speciosa* (Mart. Ex Spreng – Babaçu) é uma palmeira da família botânica Arecaceae encontrada no Brasil. O mesocarpo de babaçu (MB) representa cerca de 20,4% do fruto, sendo a maior parte utilizada para fabrico de ração animal. Neste sentido, este trabalho visou aprofundar o estudo sobre a sua caracterização nutricional pelos métodos AOAC, e determinação, por métodos cromatográficos, dos teores em açúcares livres (HPLC-RI), ácidos gordos (GC-FID), ácidos orgânicos (UPLC-DAD) e compostos fenólicos (HPLC-DAD/ESI(MS)); tendo sido também avaliada a atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e citotoxicidade do seu extrato hidroetanólico. Tendo em vista sua possível aplicação industrial, foram desenvolvidos produtos de panificação (pães) e de pastelaria (waffles) com substituições de 12, 18 e 24% da farinha de trigo pela farinha do mesocarpo de babaçu, nos quais foram estudadas as propriedades físicas e de cor, assim como avaliado o seu perfil nutricional, químico e bioativo.

A farinha do mesocarpo de babaçu apresentou os hidratos de carbono como os principais macronutrientes, assim como revelou um alto conteúdo em ácidos gordos saturados, sobretudo ácidos palmítico e esteárico. Relativamente aos compostos fenólicos, foram tentativamente identificados seis flavan-3-óis (derivados de catequina e epicatequina) e três flavonóis (*O*-glicosilados derivados de quercetina), representando o grupo dos flavan-3-óis 99% da composição fenólica total. Ainda no extrato hidroetanólico foi possível observar  $IC_{50}$  99 e 75% mais eficazes que os controlos positivos utilizados para os ensaios de TBARS e OxHLIA, respetivamente, assim como revelou capacidade citotóxica contra todas as linhas celulares tumorais testadas. Infelizmente, apresentou toxicidade contras as linhas PLP2 e VERO, e a atividade antimicrobiana, apesar de existente, revelou valores mais elevados que os controlos positivos testados.

Em ambos os produtos desenvolvidos, fortificados com farinha do mesocarpo de babaçu, foi possível observar uma significativa melhoria do perfil nutricional, quando comparada com o pão controlo (100% farinha de trigo), sobretudo no aumento de ácidos gordos poliinsaturados, boa atividade antioxidante (tendo sido novamente valores mais

baixos do que os do controlo) e ausência de atividade hepatotóxica (importante na validação da farinha para usos alimentares).

A formulação de pão com percentagem de substituição de 24% foi a que apresentou maior semelhança com o pão controlo relativamente à aspectos nutricionais, no entanto em relação aos parâmetros físicos foi o que apresentou maior discrepância, sobretudo ao nível do volume específico, textura e ao parâmetro de cor  $L^*$  (luminosidade) tendendo para uma coloração mais escura e opaca. Foi ainda a formulação que apresentou menor percentagem de envelhecimento (70%) durante todo o ensaio. Em relação aos waffles desenvolvidos, foi também a formulação com percentagem de substituição de 24% que apresentou uma coloração mais semelhante à da farinha de MB, no entanto apresentou um decréscimo de volume específico, de aproximadamente 28%. Tendo sido o waffle controlo que apresentou menor taxa de envelhecimento após 7 dias de armazenamento.

Este estudo permitiu apresentar resultados inovadores em relação à caracterização nutricional, química e bioativas tanto do mesocarpo do babaçu em si, quanto dos produtos elaborados a partir dele, apresentando grande potencial para serem aplicadas na indústria alimentar, entretanto ainda há muito o que explorar, especialmente em preparações que ainda não utilizam ingredientes não convencionais.

**Palavras-chave:** Planta alimentar não convencional (PANC); composição centesimal; composição química; propriedades bioativas; panificação; pastelaria.

## Abstract

Non-conventional food plants (PANCs) present themselves as a viable and efficient alternative for replacing the food products we consume today. Their applicability is practically unlimited due to their nutritional, chemical, physical, and biological characteristics, but also because they do not compete with other plant matrices used for human nutrition. *Attalea speciosa* (Mart. Ex Spreng - Babassu) is a palm of the botanical family Arecaceae found in Brazil. The babassu mesocarp (BM) represents about 20.4% of the fruit, most of which is used for making animal feed. In this sense, this work aimed to deepen the study on its nutritional characterization by AOAC methods, and determination, by chromatographic methods the free sugars (HPLC-RI), fatty acids (GC-FID), organic acids (UPLC-DAD), and phenolic compounds (HPLC-DAD/ESI(MS)) contents; the antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, and cytotoxicity activities of its hydroethanolic extract were also evaluated. Given its possible industrial application, bakery (bread) and pastry (waffles) products were developed with 12, 18, and 24% substitutions of wheat flour by babassu mesocarp flour, in which the physical and color properties were studied, as well as its nutritional, chemical, and bioactive profile.

The babassu mesocarp flour presented carbohydrates as the main macronutrients, as well as revealed a high content in saturated fatty acids, especially palmitic and stearic acids. Regarding phenolic compounds, six flavan-3-ols (catechin and epicatechin derivatives) and three flavonoids (*O*-glycosylated quercetin derivatives) were tentatively identified, with the flavan-3-ol group representing 99% of the total phenolic composition. Also, in the hydroethanolic extract, it was possible to observe IC<sub>50</sub> values 99 and 75% more effective than the positive controls used for TBARS and OxHLIA assays, respectively, as well as cytotoxic capacity against all tumor cell lines tested. Unfortunately, it showed toxicity against the PLP2 and VERO lines, and the antimicrobial activity, although existing, showed higher values than the positive controls tested.

In both developed products, fortified with babassu mesocarp flour, it was possible to observe a significant improvement of the nutritional profile, when compared to the control bread (100% wheat flour), especially in the increased concentration of polyunsaturated fatty acids, good antioxidant activity (presenting again lower values than the controls), and absence of hepatotoxic activity (important in validating the flour for food purposes).

The bread formulation with a replacement percentage of 24% was the one that presented the greatest similarity with the control bread concerning nutritional aspects, however, concerning the physical parameters it was the one that presented the greatest discrepancy, especially at the level of specific volume, texture and the color parameter  $L^*$  (luminosity) tending to a darker and more opaque coloration. It was also the formulation that showed the lowest percentage of aging (70%) during the whole test. Concerning the waffles developed, it was also the formulation with a replacement percentage of 24% that presented a coloration more similar to the BM flour, however, it presented a decrease in specific volume of approximately 28%. It was the control waffle that showed the lowest aging rate after seven days of storage.

This study presented innovative results regarding the nutritional, chemical, and bioactive characterization of both the babassu mesocarp itself and the products made from it, showing great potential to be applied in the food industry, however, there is still much to explore, especially in preparations that do not yet use non-conventional ingredients.

**Keywords:** Non-conventional food plant (NFPs); centesimal composition; chemical composition; bioactive properties; panification; bakery.

## Índice Geral

Resumo.....	vii
Abstract .....	viii
Índice de figuras .....	xiii
Índice de tabela .....	xiv
Índice de equações .....	xvi
Lista de abreviaturas e acrónimos .....	xvii
<b>1. Introdução.....</b>	<b>2</b>
<b>2. Revisão bibliográfica.....</b>	<b>3</b>
2.1. Plantas alimentares não convencionais (PANCs).....	3
2.2. O coco babaçu ( <i>Attalea spp</i> ) .....	4
2.3. Composição química e nutricional .....	8
2.4. Compostos de elevado valor nutricional e bioativo .....	9
2.4.1. Ácidos gordos.....	9
2.4.2. Compostos fenólicos .....	10
2.4.3. Açúcares .....	11
2.4.4. Ácidos orgânicos .....	13
2.5. Propriedades bioativas.....	14
2.5.1. Atividade antioxidante .....	14
2.5.2. Atividade citotóxica .....	14
2.5.3. Atividade antimicrobiana .....	15
2.6. Importância da aplicação de plantas alimentares não convencionais (PANC) na indústria alimentar.....	16
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>19</b>
<b>4. Metodologia.....</b>	<b>22</b>
4.1. Padrões e reagentes .....	22
4.1.1. Farinha de mesocarpo de babaçu.....	22
4.2. Determinação do valor nutricional e composição química .....	23
4.2.1. Análise do valor nutricional .....	23
4.2.2. Açúcares livres .....	24
4.2.3. Ácidos orgânicos .....	25
4.2.4. Ácidos gordos.....	26
4.3. Avaliação do potencial bioativo e perfil em compostos fenólicos .....	27

4.3.1. Preparação dos extratos hidroetanólicos .....	27
4.3.2. Determinação do perfil em compostos fenólicos .....	27
4.3.3. Avaliação da atividade antioxidante.....	28
4.3.3.1. <i>Inibição da peroxidação lipídica em tecidos cerebrais de porco através da formação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (tbars)</i> .....	28
4.3.3.2. <i>Inibição da hemólise oxidativa (oxhlia)</i> .....	30
4.3.4. Avaliação da atividade antimicrobiana .....	31
4.3.4.1. <i>Atividade antibacteriana</i> .....	31
4.3.4.2. <i>Atividade antifúngica</i> .....	32
4.3.5. Citotoxicidade .....	33
4.3.6. Hepatotoxicidade.....	34
4.3.7. Atividade anti-inflamatória .....	35
4.4. Aplicação da farinha do mesocarpo de babaçu em produtos de panificação e pastelaria	
36	
4.4.1. Elaboração dos pães .....	36
4.4.2. Elaboração dos waffles.....	37
4.5. Avaliação de parâmetros físicos dos pães e waffles desenvolvidos.....	38
4.5.1. Volume específico.....	38
4.5.2. Colorimetria.....	38
4.5.3. Análise de textura.....	39
4.5.4. Avaliação das propriedades nutricionais, químicas e bioativas dos pães e waffles desenvolvidos.....	39
4.6. Análise estatística.....	40
<b>5. Resultados e discussão.....</b>	<b>41</b>
5.1. Caracterização do mesocarpo de babaçu.....	41
5.1.1. Composição centesimal, açúcares, ácidos orgânicos e ácidos gordos.....	41
5.1.2. Composição em compostos fenólicos .....	44
5.1.3. Propriedades bioativas.....	44
5.1.3.1. <i>Atividade antioxidante e citotoxicidade</i> .....	44
5.1.3.2. <i>Atividade antimicrobiana</i> .....	48
5.2. Caracterização dos produtos de panificação (pães).....	50
5.2.1. Parâmetros físicos.....	50
5.2.2. Composição nutricional e química .....	55
5.2.2.1. <i>Composição centesimal, açúcares, ácidos orgânicos e ácidos gordos</i> .....	55

5.2.2.2. <i>Composição em compostos fenólicos</i> .....	59
5.2.3. Propriedades bioativas.....	60
5.2.3.1. <i>Atividade antioxidante e citotoxicidade</i> .....	60
5.2.3.2. <i>Atividade antimicrobiana</i> .....	62
5.3. Caracterização dos produtos de pastelaria (waffles) .....	64
5.3.1. Parâmetros físicos.....	64
5.3.2. Composição nutricional e química .....	68
5.3.2.1. <i>Composição centesimal, açúcares, ácidos orgânicos e ácidos gordos</i> .....	68
5.3.2.1. <i>Composição em compostos fenólicos</i> .....	70
5.3.3. Propriedades bioativas.....	72
5.3.3.1. <i>Atividade antioxidante e citotoxicidade</i> .....	72
5.3.3.2. <i>Atividade antimicrobiana</i> .....	73
<b>6. Conclusão e perspectivas futuras</b> .....	<b>75</b>
<b>7. Referências</b> .....	<b>79</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> No primeiro plano um cacho de babaçu. No segundo plano, palmeiras da espécie (DoDesign, 2018).....	4
<b>Figura 2.</b> Coco babaçu (Carrazza, et al., 2012). .....	5
<b>Figura 3.</b> Quebradeiras de coco babaçu recolhendo frutos e a quebra tradicional com machado e porrete (Carrazza, et al., 2012). .....	6
<b>Figura 4.</b> Cortes transversais (a) e longitudinais (b) do coco babaçu. Componentes de externo para interno: epicarpo - a; mesocarpo - b; endocarpo - c e núcleo – d (Teixeira, et al., 2007). .....	6
<b>Figura 5.</b> Exemplos de quantidade de amêndoas por coco (Lorenzi, 2010).....	7
<b>Figura 6.</b> Farinha obtida a partir do mesocarpo de babaçu (Empório das farinhas, 2020) .....	7
<b>Figura 7.</b> Diferentes classes de compostos fenólicos (Angelo, et al., 2007). .....	11
<b>Figura 8 -</b> Estrutura química de açúcares encontrados em plantas (Equipe de Artes - SEaD/UFSCar, 2011). .....	12
<b>Figura 9.</b> Estrutura dos ácidos cítrico ( <b>A</b> ) e málico ( <b>B</b> ) (Barros, Pereira, & Ferreira, 2013). .....	13
<b>Figura 10 –</b> Identificação do babaçu na lista da Portaria Interministerial MAPA/MMA nº 10, de 21 de julho de 2021 (MAPA, 2021). .....	18
<b>Figura 11 -</b> Representação esquemática do plano de trabalhos desenvolvidos. ....	20
<b>Figura 12 -</b> Reacção de MDA e TBA na formação de TBARS (Antolovich et al., 2002). .....	30
<b>Figura 13 -</b> Estrutura química da (+)-catequina e (-)-epicatequina (O mundo da química, 2020). .....	45
<b>Figura 14 -</b> Estrutura química da quercetina (Clinisciences, 2020). .....	45
<b>Figura 15 -</b> Pães e fatias em suas respectivas substituições da farinha de trigo pela farinha de mesocarpo de babaçu (Autoria própria, 2020). .....	51
<b>Figura 16 -</b> Estrutura química da apigenina (Dolcevitaaonline, 2016). .....	59
<b>Figura 17 -</b> Waffles e suas respectivas substituições da farinha de trigo pela farinha de mesocarpo de babaçu (Autoria própria, 2021). .....	65

## Índice de tabela

<b>Tabela 1</b> - Composição química, em vitaminas, em sais minerais e valor calórico da farinha de mesocarpo de babaçu (EMBRAPA, 2001).....	9
<b>Tabela 2</b> - Formulação para preparo dos pães (Autoria própria, 2020).....	37
<b>Tabela 3</b> - Formulação para preparo dos waffles (Autoria própria, 2021). ....	38
<b>Tabela 4</b> - Composição proximal, valor energético e açúcares livres da farinha proveniente do mesocarpo de babaçu (média ± DP, n = 9). ....	42
<b>Tabela 5</b> – Composição em ácidos orgânicos da farinha proveniente do mesocarpo de babaçu (média ± DP, n = 9). ....	43
<b>Tabela 6</b> - Composição em ácidos gordos da farinha proveniente do mesocarpo de babaçu (média ± DP, n = 9). ....	44
<b>Tabela 7</b> - Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do ultravioleta ( $\lambda_{max}$ ), dados de espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação (mg/g extrato) dos compostos fenólicos presentes em extratos hidroanólicos da farinha de babaçu (média ± DP). ....	46
<b>Tabela 8</b> - Atividade antioxidante, antitumoral, hepatotoxicidade e anti-inflamatória do extrato hidroetanólicos da farinha proveniente do mesocarpo de babaçu (média ± DP, n = 9). ....	47
<b>Tabela 9</b> - Atividade antibacteriana (CMI e CMB em mg/mL) do extrato da farinha de mesocarpo de babaçu. ....	49
<b>Tabela 10</b> – Parâmetros físicos dos pães formulados (média ± DP, n = 9). ....	51
<b>Tabela 11</b> – Força de compressão e taxa de envelhecimento dos pães formulados (média ± DP, n = 9). ....	53
<b>Tabela 12</b> – Parâmetros de cor de miolo dos pães formulados (média ± DP, n = 9). ....	54
<b>Tabela 13</b> - Composição proximal, valor energético, açúcares livres e ácidos orgânicos dos pães desenvolvidos (média ± DP, n = 9). ....	56
<b>Tabela 14</b> - Composição em ácidos gordos (%) dos pães desenvolvidos (média ± DP, n = 9). ....	58
<b>Tabela 15</b> - Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do ultravioleta ( $\lambda_{max}$ ), dados de espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação (mg/g extrato) dos compostos fenólicos presentes em extratos hidroanólicos dos pães desenvolvidos (média ± DP). ....	60
<b>Tabela 16</b> - Atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos dos pães desenvolvidos (média ± DP, n = 9). ....	61

<b>Tabela 17</b> - Atividade antibacteriana e antifúngica (CMI e CMB em mg/mL) das amostras dos pães desenvolvidas.....	63
<b>Tabela 18</b> – Parâmetros físicos dos waffles desenvolvidos (média ± DP, n = 9). .....	65
<b>Tabela 19</b> – Força de compressão, taxa de envelhecimento dos waffles desenvolvidos (média ± DP, n = 9). .....	66
<b>Tabela 20</b> - Parâmetros de cor dos waffles desenvolvidos (média ± DP, n = 9). .....	67
<b>Tabela 21</b> - Composição proximal, valor energético, açúcares livres e ácidos orgânicos dos waffles desenvolvidos (média ± DP, n = 9). .....	69
<b>Tabela 22</b> - Composição em ácidos gordos (%) dos waffles desenvolvidos (média±DP, n= 9). .....	70
<b>Tabela 23</b> - Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do ultravioleta ( $\lambda_{max}$ ), dados de espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação (mg/g extrato) dos compostos fenólicos presentes em extratos hidroetanólicos dos waffles desenvolvidos (média ± DP). .....	71
<b>Tabela 24</b> - Atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos dos waffles desenvolvidos (média ± DP, n = 9). .....	72
<b>Tabela 25</b> - Atividade antibacteriana (CMI e CMB em mg/mL) das amostras dos waffles desenvolvidos. ....	73

## **Índice de equações**

<b>Equação 1</b> - Hidratos de carbono.....	24
<b>Equação 2</b> . Valor energético. ....	24
<b>Equação 3</b> . Percentagem de inibição da peroxidação lipídica.....	29
<b>Equação 4</b> . Percentagem de população de eritrócitos intactos. ....	30
<b>Equação 5</b> . Tempo de atraso da hemólise. ....	31
<b>Equação 6</b> . Volume específico. ....	38

## Lista de abreviaturas e acrônimos

<b>AACC</b>	<i>American Association of Cereal Chemists/</i> Associação Americana de Químicos Cereais	<b>GC</b>	Cromatografia gasosa
<b>AAPH</b>	2-amidinopropano	<b>GI<sub>50</sub></b>	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
<b>ANOVA</b>	Análise de variância	<b>GS</b>	Sensibilidade ao glúten
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária	<b>HBSS</b>	Solução salina balanceada de Hank
<b>AOAC</b>	Associação Oficial de Químicos Analíticos	<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection/</i> Coleção de microorganismos Norte americana	<b>H<sub>t50</sub></b>	Tempo hemolítico de 50% (min)
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato	<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração responsável por 50% da atividade
<b>B0</b>	Bread/Pão com 0% substituição	<b>INT</b>	Cloreto de <i>p</i> -iodonitrotetrazóico
<b>B12</b>	Bread/Pão com 12% substituição	<b>IPT</b>	Instituto de Pesquisa do Estado de São Paulo
<b>B18</b>	Bread/Pão com 18% substituição	<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>B24</b>	Bread/Pão com 24% substituição	<b>LQ</b>	Limite de quantificação
<b>CH<sub>0</sub></b>	Densidade ótica da hemólise completa a 0 minutos	<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>CMB</b>	Concentração mínima bactericida	<b>LTQ XL</b>	<i>Ion Trap Linear XL</i>
<b>CMF</b>	Concentração mínima fungicida	<b><i>m/v</i></b>	Razão massa/volume
<b>CMI</b>	Concentração mínima inibitória	<b><i>m/z</i></b>	Razão massa/carga
<b>CNNPA</b>	Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos	<b>MA</b>	Malte ágar
<b>DAD</b>	Detetor de diodos	<b>MA (EUA)</b>	Massachusetts, Estados Unidos
<b>d<sub>f</sub></b>	Film thickness/Grossura do filme	<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>DMEM</b>	Meio Eagle modificado por Dulbecco	<b>MD</b>	Média
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido	<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>MO (EUA)</b>	Missouri, Estados Unidos
<b>DP</b>	Desvio padrão	<b>MS</b>	Espectrometria de Massa
<b>E211</b>	Benzoato de sódio	<b>MS<sup>2</sup></b>	Segunda espectrometria de massa
<b>E224</b>	Metabissulfito de potássio	<b>MUFA</b>	Ácidos gordos monoinsaturados
<b>EMBRAPA</b>	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	<b>N</b>	Newton
<b>ESI</b>	Ionização por electropulverização	<b>NCGS</b>	Sensibilidade não celíaca ao glúten
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América	<b>nd</b>	Não detetado
<b>FAME</b>	<i>Fatty Acid Methyl Ester/</i> Éter metílico de ácidos gordos	<b>NED</b>	Hidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina
<b>FBS</b>	Soro fetal de bovino	<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>FID</b>	Detetor de ionização de chama	<b>OxHLIA</b>	Ensaio da inibição da hemólise oxidativa
<b>FID</b>	Detetor de ionização de chama	<b>PP</b>	Polipropileno
<b>PI</b>	Padrão Interno (melezitose)	<b>PANC</b>	Plantas alimentares não convencionais
<b>ps</b>	Peso seco	<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino

<b>psi</b>	per square inch
<b>PUFA</b>	Ácidos gordos polinsaturados
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficiente de correlação
<b>RI</b>	<i>Refraction Index</i> (Índice de refração)
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigénio
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RPMI-1640</b>	Roswell Park Memorial Institute 1640
<b>SFA</b>	Ácidos gordos saturados
<b>S<sub>0</sub></b>	Densidade ótica da amostra no tempo 0 min
<b>SRB</b>	Sulforrodamina B
<b>S<sub>t</sub></b>	Densidade ótica da amostra no tempo t min
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico
<b>TBARS</b>	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>Tr</b>	Tempo de retenção
<b>Tris</b>	Trisaminometano
<b>Tris-HCl</b>	Trisaminometano-ácido clorídrico
<b>Trolox</b>	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
<b>TSB</b>	Caldo Soja Trypticaseína
<b>UE</b>	União Europeia
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colónias
<b>UFLC</b>	Cromatografia líquida ultra-rápida
<b>UV</b>	Radiação ultravioleta
<b>UV/Vis</b>	Radiação ultravioleta-visível
<b>V</b>	Volume
<b>VE</b>	Volume específico
<b>v/v</b>	Razão volume/volume
<b>W0</b>	Waffle com 0% substituição
<b>W12</b>	Waffle com 12% substituição
<b>W18</b>	Waffle com 18% substituição
<b>W24</b>	Waffle com 24% substituição
<b>Δt</b>	Variação de tempo
<b>λ<sub>max</sub></b>	Comprimento de onda de absorção máxima
<b>ω-3</b>	Ómega-3
<b>ω-6</b>	Ómega-6

# Introdução



## 1. Introdução

A maior parte dos consumidores está ciente que o consumo de alimentos está diretamente relacionado à saúde, influenciando no estilo de vida e promovendo uma sensação de bem-estar. Ao longo de vários anos, em todos os países europeus, registam-se cada vez mais crescente o número de doenças relacionadas ao estilo de vida, como: o cancro, doenças cardiovasculares, respiratórias e diabetes. Isto fez com que diversos países da União Europeia adotassem reformas na área da saúde, conduzindo assim a uma crescente consciência da necessidade de viver uma vida saudável. Como resultado, a procura por produtos alimentares saudáveis, funcionais, de elevado valor acrescentado, tais como especialidades regionais, produtos orgânicos, produtos étnicos etc. têm aumentado (Ribatejo, 2015). Dessa forma, o desenvolvimento e/ou melhoramento de produtos alimentares que colmatem deficiências nutricionais apresentam-se como uma área de estudo bastante promissora. A utilização de plantas alimentares não convencionas (PANCs) pode ser uma das respostas para o desenvolvimento de novos produtos alimentares ou para a melhoria de produtos já existentes, como é o caso dos produtos de panificação e pastelaria. A valorização deste tipo de plantas para alimentação humana representa uma modificação estrutural do ponto vista cultural, económico, social e nutricional. Trata-se de uma questão de segurança e de soberania alimentar estimular a produção e o consumo das plantas alimentares não-convencionais, tendo em consideração as suas características nutricionais (MAPA, 2010).

Neste sentido, o presente estudo pretende caracterizar o perfil nutricional relativamente ao conteúdo lipídico, proteico e em hidratos de carbono, assim como o perfil químico em termos de composição em açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e ácidos gordos da farinha proveniente do mesocarpo de babaçu (*Attalea speciosa*). Para além disso, pretende-se analisar as propriedades bioativas dos extratos hidroetanólicos da farinha, em termos da sua atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica averiguando a segurança da mesma. Por último, realizar a sua aplicação em dois produtos, um de panificação e um de pastelaria, com matrizes alimentares diferentes: pão e waffles, em diferentes percentagens de substituição e avaliar as suas propriedades físicas, de cor, bem como sua caracterização nutricional, química e bioativa dos extratos hidroetanólicos dos produtos obtidos.

## **2. Revisão bibliográfica**

### **2.1. Plantas alimentares não convencionais (PANCs)**

O termo planta alimentar não convencional (PANC) foi criado pelo biólogo e professor Valdely Ferreira Kinupp, segundo o qual as define como “aquelas que possuem uma ou mais partes que podem ser utilizadas na alimentação humana, tais como: raízes, tuberosas, tubérculos, bulbos, rizomas, ramos, tenros, folhas, brotos, flores, frutos, sementes e outros”.

Denominá-las “não-convencionais”, refere-se as espécies que ainda não receberam a devida atenção por parte da comunidade técnico-científica e da sociedade como um todo, resultando em consumo localizado, com dificuldade de penetração para as demais regiões do país, exercendo grande influência na alimentação e na cultura tradicional das populações. Além disso, são espécies que não estão organizadas enquanto cadeia produtiva propriamente dita, diferenciando-se das hortaliças convencionais (como a batata, tomate, repolho, alface, entre outras), e não despertando por isso o interesse comercial por parte da indústria e de empresas de sementes, fertilizantes ou agroquímicos (MAPA, 2010).

A valorização deste tipo de plantas para alimentação humana representa uma modificação estrutural do ponto vista cultural, económico, social e nutricional. Trata-se de uma questão de segurança e de soberania alimentar estimular a produção e o consumo das plantas não-convencionais, tendo em consideração as suas características nutricionais (MAPA, 2010). A introdução das PANC numa base de dieta regular poderia levar a uma diversificação e melhoria da qualidade nutricional alimentar considerando o nosso sistema agrícola atual, pois um número muito restrito de plantas está disponível para comercialização e consumo (Leal, 2015).

O cultivo de plantas não-convencionais no Brasil é feito predominantemente por agricultores privados (em seio familiar), muitos deles caracterizados como populações tradicionais (MAPA, 2010), no qual as PANCs, representam uma fonte diferenciada e diversificada de alimentos. Atualmente, o grande desafio é o levantamento de todas as espécies de PANC que estão a ser cultivadas para este propósito, e no qual será necessário fazer a sua identificação botânica, usos culinários e medicinais (Kelen, et al., 2015).

Muitas espécies de PANC são totalmente desconhecidas, de uso restrito, e distribuição geográfica limitada. No entanto, são plantas com grande resistência a fatores bióticos e abióticos, características de sabor bastante acentuadas e grande versatilidade culinária (Kinupp, 2007).

## 2.2. O coco babaçu (*Attalea spp*)

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, com mais de 40.000 espécies diferentes de plantas, representando 20% da flora do mundo, o que demonstra a importância do estudo das potencialidades dessas plantas. Entre essas, destaca-se a espécie *Attalea* (conhecida como babaçu), uma palmeira da família botânica Arecaceae encontrada em território brasileiro. Existem inúmeras variedades de babaçu, sendo as mais conhecidas e com uso mais difundido a *Attalea phalerata* e *Attalea speciosa*. Caracteriza-se como uma planta monocaule, com até 20 metros de altura e estipe liso, medindo até 41 cm de diâmetro, com 4 racemos e cerca de 15–25 frutos cada, os frutos são oblongos-elipsoides lisos, com cerca de 11,3 x 6,3 cm de diâmetro e pesam 90 - 280 g cada (**Figura 1**) (Sapiência, 2010).



**Figura 1.** No primeiro plano um cacho de babaçu. No segundo plano, palmeiras da espécie (DoDesign, 2018).

O babaçu é considerado o maior recurso oleífero nativo do mundo (EMBRAPA, 2001). É um dos principais produtos extrativos do Brasil, contribuindo de maneira significativa para a economia de alguns estados da Federação. A cadeia produtiva do babaçu é uma das mais representativas do extrativismo vegetal no Brasil, devido à área de abrangência da sua produção (13 a 18 milhões de hectares em 279 municípios, situados em 11 Estados), bem como das inúmeras potencialidades e atividades econômicas que

podem ser desenvolvidas a partir dela, de sua importância para famílias que sobrevivem da agricultura de subsistência associada à sua exploração, e da forte mobilização social e política em favor do acesso livre aos babaçuais (EMBRAPA, 2001) (Carrazza, et al., 2012).

A época de frutificação desta planta ocorre durante todo o ano, sendo os meses de agosto a janeiro considerados o pico da produção, podendo cada planta produzir até seis cachos de coco babaçu (**Figura 2**), é uma árvore de suma importância na conservação e melhoramento do solo (MAPA, 2010).



**Figura 2.** Coco babaçu (Carrazza, et al., 2012).

A sua importância social é acentuada pela grande capacidade de absorção de mão-de-obra, principalmente na entressafra das culturas tradicionais dos estados onde, segundo o Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), apenas nos estados do Maranhão, Piauí e Goiás, cerca de 2.069.917 pessoas estão envolvidas, direta ou indiretamente, na exploração do babaçu (EMBRAPA, 2001). Ou seja, milhares de famílias sobrevivem da extração da amêndoa, através do trabalho manual da sua quebra, comumente feito pelas quebradeiras de coco, com auxílio de um machado ou uma cunha (**Figura 3**), e um porrete de madeira para atingir o fruto sobre a lâmina e recuperar as amêndoas (Sapiência, 2010).

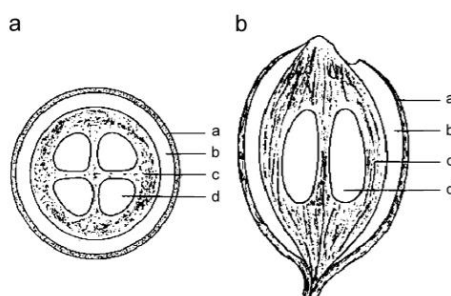
As potencialidades do babaçu vão desde o aproveitamento do coco, como o seu desdobramento em todas as frações primárias (

**Figura 4**) do epicarpo, mesocarpo, endocarpo e amêndoas (Sapiência, 2010). Sua exploração econômica é realizada de diversas formas: para alimentação humana, medicina popular, como materiais de limpeza e cosméticos. Artesanalmente, podem-se

obter vários utensílios domésticos a partir da manipulação de partes da planta. Por outro lado, tal aproveitamento sempre colidiu com a falta de tecnologia que viabilizasse a obtenção e a aplicação de tais produtos (Sapiência, 2010).



**Figura 3.** Quebradeiras de coco babaçu recolhendo frutos e a quebra tradicional com machado e porrete (Carrazza, et al., 2012).



**Figura 4.** Cortes transversais (a) e longitudinais (b) do coco babaçu. Componentes de externo para interno: epicarpo - a; mesocarpo - b; endocarpo - c e núcleo - d (Teixeira, et al., 2007).

O epicarpo representa 12,6% do fruto, sendo a camada mais externa e fibrosa. As fibras do epicarpo do coco babaçu pode ser aproveitada para a produção de xaxim, estofados de banco de carros, vasos, embalagens em substituição ao poliestireno, queima em fornos caseiros e comerciais. A fibra do epicarpo é biodegradável e propicia a retenção de humidade. Pode ser utilizada em larga escala em cultivos protegidos (estufas ou viveiros) e no paisagismo. Não desequilibra ou afeta os solos, plantas ou animais (Carrazza, et al., 2012).

O endocarpo representa 58.5% do fruto, é a camada mais resistente com 2 a 3 cm de espessura, sendo muito utilizado como combustível substituto da lenha, na agricultura,

para artesanatos diversos, bem como na indústria alimentícia, veterinária, farmacêutica e química (Carrazza, et al., 2012).

A dureza do endocarpo do coco dificulta a extração das amêndoas sem as danificar. Amêndoas danificadas estão mais propícias à rancificação, quando isto ocorre, tornam-se impróprias para a sua aplicação na indústria de cosméticos e alimentação. Nestes casos, o óleo proveniente das amêndoas é utilizado apenas em indústrias de produtos de limpeza e higiene (Lorenzi, 2010). A quantidade de amêndoas por coco pode variar entre 1 e 8, sendo a média de 3 a 4 (**Figura 5**), representando 8,7% do fruto, medindo 2,5 a 6 cm de comprimento e 1 a 2 cm de largura. A amêndoa do coco babaçu é composta por mais de 60% de óleo, utilizado na indústria cosmética e alimentar (Carrazza, et al., 2012).



**Figura 5.** Exemplos de quantidade de amêndoas por coco (Lorenzi, 2010).

O mesocarpo de babaçu (**Figura 6**) representa 20,4% do fruto, é a camada abaixo do epicarpo, com 0,5 a 1,0 cm de espessura. É um subproduto da indústria de extração de óleo de babaçu, no entanto grande parte da sua aplicação é também para ração animal e alimentação humana. É produzido durante a separação das amêndoas de coco, é uma fonte de amido comestível, exibindo propriedades antioxidantes e antimicrobianas devido à sua composição rica em compostos fenólicos e flavonoides (de Carvalho Silva, et al., 2019).



**Figura 6.** Farinha obtida a partir do mesocarpo de babaçu (Empório das farinhas, 2020)

A produção de mesocarpo de babaçu para a alimentação humana obedece a critérios rigorosos de salubridade do produto. Dessa forma, os flocos de mesocarpo devem ser extraídos apenas de cocos maduros sem marcas ou sinais de ação de roedores (Carrazza, et al., 2012).

O óleo de babaçu corresponde a apenas 7% do peso total da fruta, enquanto as demais partes, como epicarpo, endocarpo e mesocarpo, somam até 93%, as quais são posteriormente utilizadas como biomassa e alimento para animais (Teixeira, et al., 2007). Em virtude das diversas potencialidades do babaçu, busca-se, atualmente, o desenvolvimento tecnológico de novos produtos a partir do mesocarpo, para isso, tornam-se necessários estudos preliminares, pois apesar de ser vasta a bibliografia a respeito do babaçu como planta oleaginosa, poucos são os trabalhos e as pesquisas dedicadas exclusivamente à sua farinha.

### **2.3. Composição química e nutricional**

O mesocarpo de babaçu é muito utilizado por fabricantes de rações alimentares, por ser rico em açúcares e, conseqüentemente, de alto valor nutricional e calórico (Carneiro, et al., 2013). A farinha do mesocarpo além de apresentar elevados teores de amido, fibras, cinzas, lipídios e proteínas, apresenta também atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatórias e analgésicas (Maniglia, et al., 2016).

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) desenvolveram o Programa Nacional de Pesquisa do Babaçu que reúne um acervo de atividades de investigação, contemplando as formações naturais de babaçu e de pesquisas básicas buscando o conhecimento da planta e o seu comportamento agrônomico. No qual consta a composição da farinha do mesocarpo de babaçu em termos de vitaminas, sais minerais e composição química, apresentados na **Tabela 1**.

A farinha produzida a partir do mesocarpo do coco de babaçu além de nutritiva por seu elevado teor de hidratos de carbono e presença de fibras; pode também ser modificada quimicamente o seu perfil lipídico de forma a ser introduzido em dietas para animais e, conseqüentemente, diminuir significativamente os níveis de glicemia nos mesmos (Simeone, et al., 2019). O alto conteúdo de fibras e de compostos com atividade biológica

eleva a qualidade da farinha do babaçu como alimento, adicionando-lhe valor económico e atendendo uma demanda crescente por parte dos consumidores por novos produtos alimentares (Mintel, 2018).

**Tabela 1** - Composição química, em vitaminas, em sais minerais e valor calórico da farinha de mesocarpo de babaçu (EMBRAPA, 2001).

Vitaminas	mg/100g	Componentes	g/100g	Sais minerais	mg/100g
<b>C</b>	Não detetado	<b>Humidade</b>	14,06	<b>Cálcio</b>	27,4
<b>B1</b>	0,94	<b>Proteínas</b>	1,19	<b>Ferro</b>	1,23
<b>B2</b>	0,5	<b>Cinzas</b>	0,61	<b>Fósforo</b>	32,86
<b>B6</b>	Não detetado	<b>Fibra bruta</b>	1,83	<b>Sódio</b>	0,47
		<b>Fibra alimentar</b>	6,8	<b>Magnésio</b>	41,16
		<b>Amido</b>	66,51	<b>Manganês</b>	0,16
		<b>Hidratos de Carbono</b>	77,05	<b>Potássio</b>	289,52
		<b>Taninos</b>	3,3	<b>Alumínio</b>	0,44
		<b>Colesterol (mg/100g)</b>	<1	<b>Chumbo</b>	0,06
		<b>Valor energético (Kcal/100g)</b>	315,57	<b>Cobre</b>	0,35
				<b>Cromo/ Molibdénio/ Selênio/ Cobalto/ Zinco</b>	Não detetado

## 2.4. Compostos de elevado valor nutricional e bioativo

### 2.4.1. Ácidos gordos

Os ácidos gordos são compostos que têm uma influência muito significativa na saúde do consumidor, sendo classificados em saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA) (Bockisch, 1998). São os principais componentes dos fosfolipídios e triglicerídeos, e os PUFA, como por exemplo os ácidos linoléico e  $\alpha$ -linolénico, como não sintetizados pelo corpo humano, torna-se essencial o seu consumo através da alimentação (Chow, 2007). Os ácidos gordos em geral, contribuem para

diversas funções metabólicas de obtenção de energia, mas também funções estruturais ao nível celular, devendo por isso serem consumidos diariamente. Os produtos cárneos apresentam teores elevados de SFA, enquanto os vegetais são ricos fontes em ácidos gordos insaturados, com efeitos benéficos reconhecidos e amplamente documentados para a saúde do consumidor (Azevedo, 2014).

Em estudo anterior realizado pela EMBRAPA (2001), a composição em ácidos gordos na farinha de mesocarpo de babaçu foi devidamente caracterizada, sido encontrados os ácidos palmítico, esteárico e oleico em concentrações de 0,045, 0,008 e 0,04 g/100g, respetivamente.

#### **2.4.2. Compostos fenólicos**

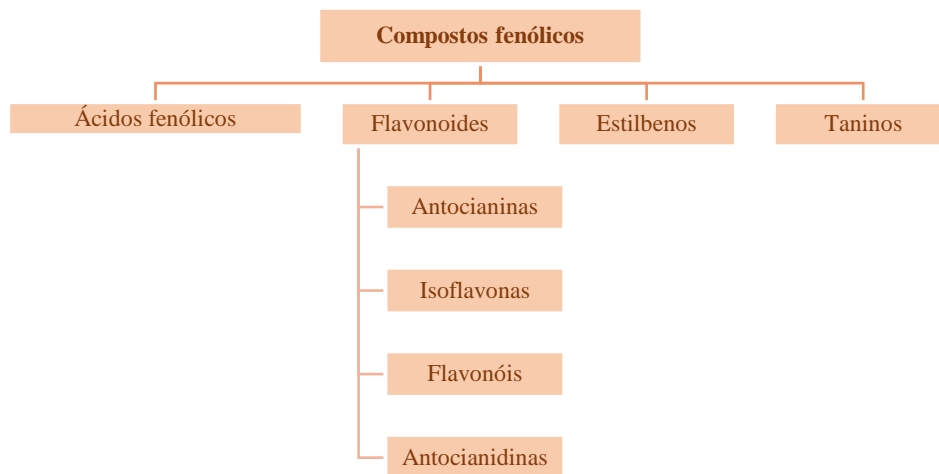
Os compostos fenólicos são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas sendo componentes importantes no seu desenvolvimento e reprodução, podendo ainda ser formados devido a fatores como condições de stress, radiação UV, entre outros (Angelo, et al., 2007). Estes compostos são abundantes em frutos, vegetais e alimentos derivados dos mesmos, conferindo cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa (Soethe, et al., 2016).

São classificados de diferentes formas (**Figura 7**), de acordo com os grupos funcionais ligados ao fenol, ou com base no número de unidades de fenol na molécula. Possuem várias subclasses, entre elas algumas das mais conhecidas como as antocianinas, os flavonoides e isoflavonas (Soares, 2002).

Os produtos naturais exercem efeitos protetores, pois atuam na remoção de radicais livres e na imunomodulação. Estudos epidemiológicos têm sugerido que produtos naturais ricos em flavonoides reduzem os riscos de diabetes, distúrbios neurodegenerativos e distúrbios cardiovasculares (Clere, 2011).

A sua composição nas plantas varia de acordo com a espécie, cultivar, estado de maturação, condições climáticas e até mesmo com as condições de armazenamento (Melo, et al., 2008). Compostos fenólicos podem atuar como antioxidantes naturais adequados para substituir os sintéticos e interferir no processo de oxidação e na alteração de lípidos, proteínas e DNA (Neffati, et al., 2017). Os antioxidantes naturais também

podem fornecer proteção contra doenças degenerativas, particularmente doenças cardiovasculares, cancro e inibição de radicais livres (Pérez-Jiménez, et al., 2008).



**Figura 7.** Diferentes classes de compostos fenólicos (Angelo, et al., 2007).

As propriedades anti-inflamatórias e analgésicas do mesocarpo de babaçu foram confirmadas experimentalmente por Da Silva e Parente (2001), utilizando um extrato de clorofórmio dos frutos secos. O efeito pode estar relacionado aos triterpenos presentes em *Attalea Speciosa* (García-Pastor, et al., 1999). Outros compostos também foram encontrados no babaçu, como taninos, açúcares, saponinas e compostos esteroides (Bandeira, et al., 1986). Sabe-se que mesocarpo do coco babaçu possui flavonoides os quais apresentam atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória, contudo, os efeitos de toxicidade crônica, subcrônica e aguda não estão descritos na literatura.

### 2.4.3. Açúcares

Os glúcidos são, de longe, as moléculas orgânicas mais abundantes na natureza e quase todos os organismos sintetizam e metabolizam essas moléculas. O termo hidrato de carbono (também utilizado para referir glúcidos) surgiu de o facto dos açúcares mais simples terem a fórmula empírica  $C_nH_{2n}O_n$ , onde  $n \geq 3$ , sugerindo que os átomos de carbono estejam, de alguma forma, combinados com água (Wade, 1999).

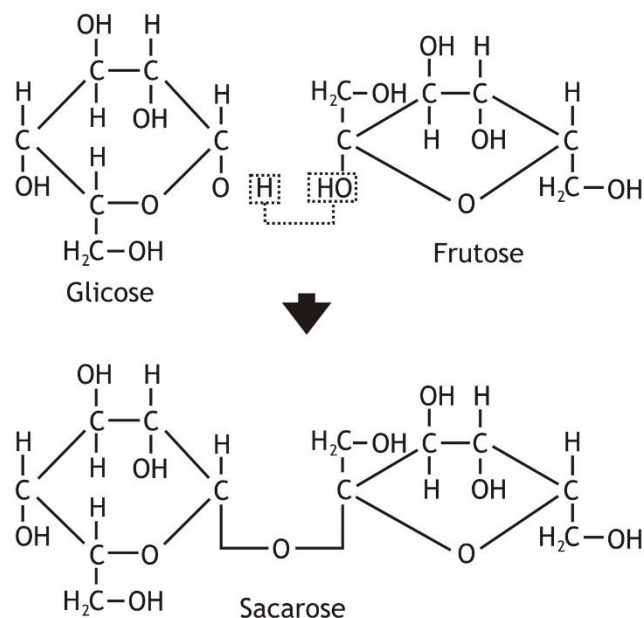
Os açúcares atuam de várias formas nos alimentos, e as suas propriedades estão diretamente relacionadas com sua a concentração e estrutura química. O açúcar de reserva das plantas está presente em maior quantidade nos chamados vegetais amiláceos, mas também está também presente em frutos secos, leguminosas e em cereais e seus

derivados, como farinhas de cereais e conseqüentemente, produtos de panificação (Cox, et al., 2004). São um dos principais grupos de substâncias alimentares (hidratos de carbono, proteínas e gorduras) a ser sintetizado na planta a partir de simples substâncias orgânicas (Lee, et al., 1970).

A glucose (**Figura 8**), por exemplo, é um monossacárido comum que é oxidado para formar dióxido de carbono e água, fornecendo energia para os processos celulares como síntese de proteínas, circulação e transporte. As plantas apresentam inúmeras moléculas de glucose ligadas entre si para formar moléculas com grande capacidade de armazenamento de energia, tal como o amido (Wade, 1999).

A frutose (**Figura 8**), comumente designada por açúcar das frutas, é um monossacárido muito abundante nas plantas, podendo encontrar-se ligada à glucose para formar um dissacarídeo igualmente presente em plantas, denominado por sacarose (MAFF, 1987).

A sacarose (**Figura 8**) é o dissacarídeo mais amplamente adicionado aos produtos alimentares e tem muitas fontes, sendo dominantes a cana-de-açúcar e a produção de beterraba (MAFF, 1987).

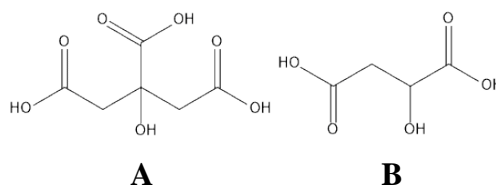


**Figura 8** - Estrutura química de açúcares encontrados em plantas (Equipe de Artes - SEaD/UFSCar, 2011).

#### 2.4.4. Ácidos orgânicos

Muitos ácidos orgânicos são exsudados pelas raízes das plantas, onde as concentrações variam de acordo com fatores genéticos e condições de stress a que as plantas estão sujeitas (Jones, 1998). Fazem parte do grupo de substâncias que tem influência sobre o sabor, aroma e aparência das hortaliças (Calbo & Henz, 2007). Uma característica principal destes compostos é o seu potencial de dissociação (Ferreira, 2001). Os ácidos orgânicos (geralmente ácidos cítricos e málicos) influenciam o sabor, cor e aroma de vegetais e frutas (Vaughan, 1997).

Os principais ácidos encontrados nas hortaliças, grupo no qual se integram as plantas em estudo segundo a classificação de hortaliças da ANVISA, na Resolução - CNNPA no 12 de 1978, são os ácidos cítrico e málico (**Figura 9**). São várias as formas de detecção dos ácidos orgânicos podendo ser utilizados métodos espectrofotométricos, eletroforese capilar e cromatografia, sendo esta última a metodologia mais utilizada uma vez que permite a identificação individual e quantificação dos compostos (Santos, et al., 2014).



**Figura 9.** Estrutura dos ácidos cítrico (A) e málico (B) (Barros, Pereira, & Ferreira, 2013).

Os ácidos orgânicos estão envolvidos em várias vias fundamentais no metabolismo vegetal e no catabolismo como produtos intermediários ou finais. Apresentam também uma reduzida suscetibilidade para sofrer modificações durante o processo de armazenamento, porém, a característica de maior importância dos ácidos orgânicos é o papel protetor que desempenha contra várias doenças em função da sua atividade antioxidante, podendo quelar metais ou deslocar a carga eletrônica proveniente dos radicais livres (Barros, Pereira, & Ferreira, 2013).

## **2.5. Propriedades Bioativas**

As propriedades bioativas de extratos de plantas estão diretamente relacionadas com a sua composição química e concentração de compostos bioativos.

### **2.5.1. Atividade antioxidante**

O organismo possui um complexo sistema de proteção antioxidante, como mecanismo de defesa contra os radicais livres, que são formados constantemente no metabolismo celular normal, mas sobretudo em condições de stress para o organismo. Em condições normais, estes radicais estão envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, imunidade e defesa celular e síntese de substâncias biológicas (Celi, 2010). Quando em excesso, podem ocasionar a oxidação de moléculas e tecidos biológicos, como a peroxidação dos lipídios da membrana e degradação das proteínas dos tecidos e das membranas, enzimas, hidratos de carbono e DNA (Celi, 2010). O desequilíbrio entre o mecanismo oxidativo e a capacidade de defesa antioxidante do organismo é denominado de estresse oxidativo (Machado, et al., 2009).

As moléculas antioxidantes por sua vez, por serem capazes de evitar o desenvolvimento de processos oxidativos, possuem a função protetora, atuando na inibição e/ou eliminação da formação dessas espécies reativas. Vários fatores abióticos são responsáveis pela proliferação destas espécies reativas de oxigénio (ROS), na qual os antioxidantes atuam como neutralizadores do efeito deteriorador das ROS, desempenhando assim um papel crucial na preservação de funções celulares essenciais para a manutenção de todos os sistemas biológicos (Neha et al., 2019).

### **2.5.2. Atividade citotóxica**

O desenvolvimento de um processo cancerígeno é complexo e com diferentes estágios de desenvolvimento e propagação (Ide et al., 2001) que pode ser iniciado por erros na molécula de DNA, após exposição a poluentes ambientais, radiação UV ou espécies reativas de oxigénio formadas endogenamente. Estes erros ao nível do DNA podem levar a mutações que quando acumuladas podem levar à transformação de células

normais em células tumorais. Um fator de risco adicional para o desenvolvimento de cancro pode ser a presença de inflamação (Multhoff et al., 2012).

Os estudos de citotoxicidade são muito prementes para determinar o potencial tóxico de extratos de plantas ou compostos biologicamente ativos isolados das mesmas. É uma ferramenta também muito valiosa para a diferenciação entre a capacidade de provocar apoptose ou necrose nas células tumorais *in vitro*. Para além disso, permite a determinação da cinética de dependência da dose e do tempo de morte celular, permitindo uma previsão da toxicidade real dos extratos em estudo (Ahn et al., 2019).

Para serem utilizados em produtos para consumo humano, os compostos vegetais naturais e seus derivados devem ser seguros, não apresentando por isso toxicidade e genotoxicidade (Gateva et al., 2019).

### **2.5.3. Atividade antimicrobiana**

As propriedades antimicrobianas das plantas estão relacionadas com a capacidade de agir contra microrganismos patogénicos. Os compostos com potencial antimicrobiano podem atuar de diferentes formas para grupos particulares de microrganismos, consoante o microrganismo sobre o qual está a atuar (Shimamura et al., 2007). Para além de danificar os sistemas enzimáticos celulares e comprometer o material genético de uma célula bacteriana e/ou fúngica, podem também ter outros alvos celulares, como por exemplo a bicamada lipídica da membrana celular (Sánchez et al., 2010).

Os compostos das plantas que normalmente apresentam este potencial são as saponinas, taninos, alcaloides, alcenilfenóis, glicoalcalóides, compostos fenólicos, sesquiterpenos, lactonas e terpenóides (Tajkarimi et al., 2010).

No que diz respeito ao uso de antimicrobianos naturais nos alimentos, a falta de reprodutibilidade de sua atividade é um dos principais obstáculos, apesar da grande diversidade de compostos que contêm. Variações qualitativas e quantitativas no conteúdo de fitoquímicos bioativos em extratos vegetais resultam em sua eficácia variável. Além disso, a extrapolação dos resultados obtidos de experimentos *in vitro* com mídias de laboratório para produtos alimentares não é simples, pois os alimentos são sistemas complexos e multicomponentes que consistem em diferentes microambientes interconectados. Embora exista um grande potencial para agentes antimicrobianos naturais na preservação dos alimentos, a maior parte da literatura apresenta dados de

inativação de alimentos modelo ou mídia laboratorial. O nível de conservantes naturais necessários para eficácia suficiente pode ser consideravelmente maior em produtos alimentares em comparação com os meios de comunicação laboratoriais, o que pode impactar negativamente as propriedades organolépticas dos alimentos (Negi, 2012).

Embora inúmeros estudos tenham sido feitos *in vitro* para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais, muito poucos estudos estão disponíveis para produtos alimentares, provavelmente porque extratos vegetais não produziram inibição tão acentuada quanto muitos dos compostos puros nos alimentos. O impacto da formulação de produtos e parâmetros de armazenamento sobre a eficácia dos antimicrobianos naturais, bem como a avaliação de segurança e toxicologia desses antimicrobianos naturais requerem um estudo aprofundado (Negi, 2012).

## **2.6. Importância da aplicação de plantas alimentares não convencionais (PANC) na indústria alimentar**

As práticas alimentares tiveram mudanças significativas em razão da modernidade e das transformações tecnológicas na indústria de alimentos, ocasionando impactos à saúde humana, relacionando a alimentação às doenças crônicas como hipertensão, diabetes, sobrepeso, tendo predomínio de déficits nutricionais (Kac, et al., 2003).

Em cada canto do planeta onde existe vegetação diversa, com exceção das regiões que na maior parte do ano são cobertas de gelo, tem-se biomas e seus respectivos ecossistemas com excepcional diversidade de fauna e flora com grande competência alimentícia (Köhler, et al., 2016). Existe um potencial a ser explorado nas plantas alimentares não convencionais, visto que são alimentos funcionais para o organismo humano devido às suas propriedades, propiciando benefícios à saúde através de seu consumo, além do mais, a carência de estudos e informações em torno deste tema faz com que por vezes, as plantas, folhas e frutos sejam desperdiçados por não haver conhecimento de seu potencial. Kinupp e Lorenzi (2014) relatam que estes alimentos não convencionais que são desperdiçados poderiam servir para produção de geleias, sendo fornecidas a merenda escolar, promovendo uma alimentação nutritiva a partir das PANCs.

O controle dos sistemas agroalimentares tem levado a uma progressiva padronização das dietas e, conseqüentemente, ao negligenciamento e abandono de uma

enorme diversidade PANCs essenciais para a soberania e a segurança alimentar e nutricional dos povos. Segundo as Organizações das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, na sigla em inglês), apenas 15 espécies cultivadas correspondem atualmente por 90% da alimentação mundial, com apenas três delas (arroz, milho e trigo) representando apenas dois terços do total. Em um estudo realizado em 2011 por Biswas & Rahmatullah, demonstrou que num período de escassez de alimentos, as PANC apresentam-se como uma alternativa viável e eficiente para a substituição dos produtos alimentares que consumimos hoje em dia.

A indústria alimentar apresenta-se como uma das muitas áreas a abordar para a aplicação destas plantas, visto que a sua aplicabilidade em produtos alimentares é ilimitada, uma vez que apresentam uma grande variedade de produtos, como por exemplo produtos de panificação e pastelaria possuem uma grande flexibilidade na modificação das formulações e receitas dos mesmos, além de ser transversal a todas as faixas etárias de consumidores e por isso, o nicho de mercado para o desenvolvimento de novos produtos alimentares é enorme (Islam et al., 2007).

Este tipo de plantas podem também ser usadas como fontes de óleos e gorduras, usadas como especiarias, substituintes do sal, como edulcorantes, para o fabrico de bebidas, como tonificantes ou ainda em infusões (Kinupp & Barros, 2004). Por outro lado, existem cada vez mais consumidores que possuem intolerâncias que não lhes permitem consumir produtos de panificação por conterem por exemplo trigo ou sementes de elevado conteúdo em glúten, sendo denominadas de sensibilidade não celíaca ao glúten (NCGS) ou sensibilidade ao glúten (GS), respetivamente. Várias farinhas podem ser misturadas à farinha de trigo para uso em produtos de panificação, denominando-se tal mistura de farinha mista ou composta (El-Dash.; Germani, 1994). Inúmeros estudos têm sido realizados no sentido de substituir o trigo na elaboração de produtos de panificação devido ao crescimento da procura por produtos com baixo ou nenhum conteúdo em glúten, ou seguindo a tendência atual de fortificação de pães, devido à necessidade de suprimir as deficiências em nutrientes disponíveis neste tipo de produto, levou a indústria alimentar a readaptar-se a estes novos consumidores mais exigentes com os produtos alimentares que consomem (Czaja-Bulsa, 2015; Gao et al., 2018). Bem como o ramo de pastelaria, que é um segmento culinário essencialmente ligado à produção de doces,

nomeadamente pasteis, bolos, tartes e afins, onde a disponibilidade desses produtos numa versão fortificada/saudável ou disponível para o público com restrições é ainda menor.

Em 21 de Julho de 2021 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em conjunto com o Ministério do Meio Ambiente (MMA) do Brasil, publicaram no Diário Oficial da União, a Portaria Interministerial n° 10, que institui uma lista de espécies nativas da sociobiodiversidade de valor alimentar para fins de comercialização in natura ou de seus produtos derivados, no âmbito das políticas públicas de estímulo à agricultura familiar. A lista com 94 espécies nativas da sociobiodiversidade, contém frutas, castanhas e verduras nativas do Brasil cuja comercialização é permitida. O babaçu (*Attalea speciosa*) está incluso na lista (**Figura 10**) junto a outras plantas citadas nas oficinas de mapeamento realizadas por serem cultivadas por agricultores familiares, povos indígenas e comunidades tradicionais, como quilombolas e quebradeiras de coco. Este facto representa um enorme e importante avanço para a inclusão de novos produtos da sociobiodiversidade para uso alimentar, possibilitando a oferta diversificada de produtos sustentáveis que podem atender os mercados institucionais e privados, gerando renda e assegurando a qualidade de vida dos povos, comunidades tradicionais e agricultores familiares, ou seja, não se trata apenas do valor monetário, mas também os valores étnicos, sociais, culturais e ambientais.

Nome Popular	Nome Científico	Família	Partes mais utilizadas e exemplos de uso	Distribuição geográfica natural das espécies - regiões/estados	Situação de Cultivo
Babaçu	<i>Attalea speciosa</i>	Arecaceae	Amêndoa ( <i>in natura</i> , cocada, doce, floco, leite, óleo, pudim, sorvete ou torrada); Polpa do fruto (farinha – bolo, mingau, pão, pudim)	Norte (AC, AM, PA, RO, TO); Nordeste (BA, CE, MA, PI); Centro-Oeste (GO, MS, MT); Sudeste (MG)	Colhida na natureza

**Figura 10** – Identificação do babaçu na lista da Portaria Interministerial MAPA/MMA n° 10, de 21 de julho de 2021 (MAPA, 2021).

### 3. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo principal a caracterização do mesocarpo do babaçu, denominado como uma planta alimentar não convencional (PANC), e avaliar o seu potencial de aplicação em produtos de panificação e pastelaria. Os objetivos específicos estão descritos abaixo, com as metodologias implementadas, e o plano de trabalho encontra-se esquematizado na **Figura 11**.

- ❖ Avaliação nutricional da farinha do mesocarpo de babaçu por métodos AOAC, nomeadamente, cinzas, gordura total, proteínas, hidratos de carbono e valor energético;
- ❖ Determinação da composição química em:
  - Açúcares por HPLC acoplada a um detetor RI;
  - Ácidos orgânicos por UFLC acoplado a um detetor DAD;
  - Ácidos gordos por GC acoplada a um detetor FID.
- ❖ Preparação de extratos hidroetanólicos (80:20 v/v) a partir da farinha do mesocarpo de babaçu;
- ❖ Determinação do perfil fenólico da farinha por HPLC-DAD/ESI-MS;
- ❖ Avaliação *in vitro* das propriedades bioativas de extratos hidroetanólicos obtidos a partir da farinha em estudo:
  - Antioxidante: inibição da peroxidação lipídica através do ensaio das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA);
  - Antimicrobiano: utilizando estirpes de bactérias e fungos alimentares ATCC através do método da microdiluição;
  - Citotóxica:
    - Atividade antitumoral: utilizando quatro linhas celulares tumorais, nomeadamente MCF-7 (carcinoma da mama), AGS (adenocarcinoma gástrico), NCI-H460 (carcinoma de pulmão) e CaCo (adenocarcinoma colorretal);
    - Hepatotoxicidade: avaliado utilizando uma cultura primária obtida a partir de células normais de fígado de porco (PLP2) e de rim de macaco (VERO);

→ Anti-inflamatória: avaliado utilizando a linha celular de macrófagos de rato (RAW 264.7).

❖ Aplicação da farinha do mesocarpo de babaçu em produtos de panificação e de pastelaria, pão e waffles, com a substituição de 12, 18 e 24% da farinha de trigo, bem como o desenvolvimento do pão controle.

- Avaliação das propriedades físicas, organolépticas, nutricionais, químicas e bioativas dos produtos obtidos, em comparação com produto à base de 100% farinha de trigo.

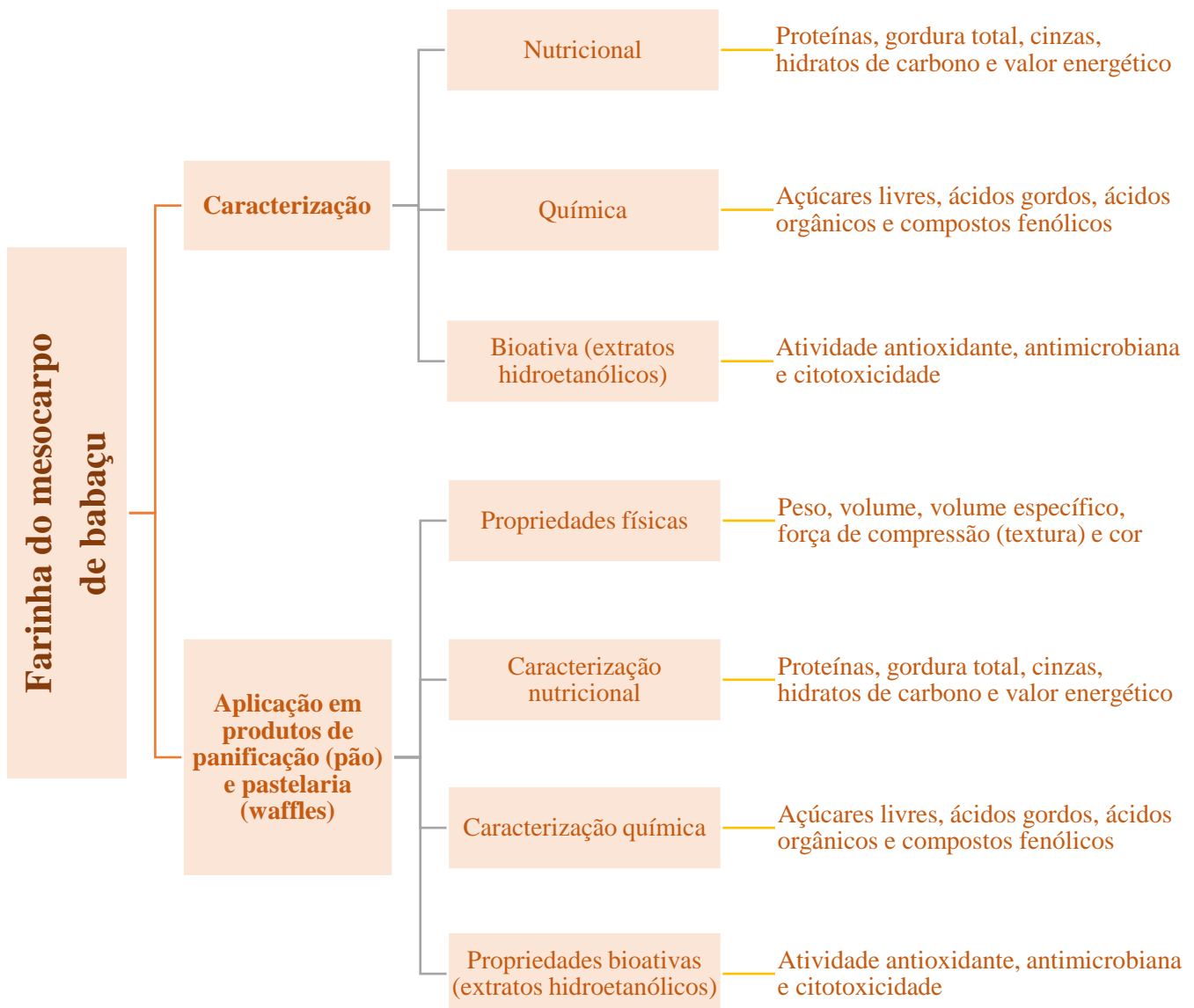


Figura 11 - Representação esquemática do plano de trabalhos desenvolvidos.

# Metodologia



## 4. Metodologia

### 4.1. Padrões e Reagentes

A mistura padrão de referência de éster metílico de ácidos gordos (FAME) 37 (padrão 47885-U) foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), bem como os isômeros dos ácidos gordos individuais, açúcares (D(+)-sacarose e D(+)-melezitose) e padrões de ácidos orgânicos (ácido oxálico, ácido chiquímico, ácido fumárico, e ácido quínico). Para a análise de compostos fenólicos, o acetonitrilo (99,99%) de grau HPLC e ácido fórmico foram adquiridos na Fisher Scientific (Lisboa, Portugal) e Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), respetivamente, e os padrões de compostos fenólicos (ácido caféico, apigenina-6-C-glucósido, catequina e quercetina-3-O-glucósido) na Extrasynthèse (Genay, França).

No ensaio de inibição da hemólise oxidativa o reagente dicloro-hidrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano - AAPH) foi adquirido na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Para os ensaios hepatotoxicidade foram utilizados soro fetal de bovino (FBS), solução salina balanceada de Hank (HBSS), tripsina, solução de penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100 µg/mL), RPMI-1640 (meio Instituto Memorial Parque Roswell) e meio DMEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco) adquiridos na Hyclone (Chicago, Illinois, EUA). O ácido acético, elipticina, sulforodamina B (SRB), dexametasona, lipopolissacarídeo (LPS), Azul de Trypan e Trisaminometano (Tris) foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

A água destilada utilizada foi tratada num sistema de purificação Milli-Q (Millipore, model A10, Billerica, MA, USA).

#### 4.1.1. Farinha de mesocarpo de babaçu

O mesocarpo de babaçu foi obtido a partir de uma doação realizada pelo Professor de biologia Alexandre Mendes da Rocha. Essa doação faz parte de uma iniciativa da Rede Municipal da cidade de São João do Arraial, Piauí/Brasil que fomenta o incentivo à pesquisa e à economia local, adquirindo este produto diretamente das cooperativas locais, neste caso, foi adquirido da Cooperativa Interestadual das Quebradeiras do Coco Babaçu, em embalagens de 1 kg e armazenadas em local fresco e arejado. A farinha de

trigo utilizada foi obtida do moinho Rio Azul, Paraná/Brasil e os demais ingredientes adquiridos em comércio local das cidades de Medianeira, Paraná/Brasil e Bragança, Bragança/Portugal.

## **4.2. Determinação do valor nutricional e composição química**

### **4.2.1. Análise do valor nutricional**

Foi avaliada a composição em macronutrientes (proteínas, gordura total, cinzas e hidratos de carbono), humidade e valor energético do mesocarpo de babaçu, conforme os métodos oficiais de análise descritos pela AOAC (2016). A determinação da humidade presente na amostra foi realizada colocando uma quantidade conhecida de amostra (2 g) numa balança de humidade digital (PMB series, ae ADAM), por um período de aproximadamente 7 min. O teor de humidade foi determinado por diferença de peso da amostra e expresso em percentagem (%).

A análise do teor de proteínas foi realizada segundo o método macro-Kjeldahl (AOAC 978.04), o qual se baseia na conversão do azoto total. Na digestão da matéria orgânica, à amostra (0,5 g) foram adicionados 15 mL de ácido sulfúrico, que irá reter o azoto sob a forma de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . No aparelho de macro-Kjeldahl é adicionado NaOH, por volumetria de retrocesso, que irá libertar o azoto sob forma de  $\text{NH}_3$ , posteriormente coletado por destilação a vapor numa solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1N. Finalmente, é feita uma titulação com NaOH 0,1N, usando vermelho de metilo como indicador para calcular a quantidade de azoto, utilizando como fator de conversão  $N$  (quantidade de azoto) x 6,25, e os resultados expressos em g/100 g peso seco.

A gordura total foi determinada através da extração de uma massa conhecida da amostra (3g), utilizando um aparelho de Soxhlet, com éter de petróleo, durante aproximadamente 8 horas (entre 16 a 20 voltas no aparelho de Soxhlet), uma temperatura de cerca 120 °C (AOAC 920.85). A fração volátil foi evaporada e a fração lipídica colocada numa estufa até atingir peso constante. Os resultados foram expressos em g/100 g de peso seco.

O teor de cinzas foi determinado por incineração de cerca de 0,5 g de amostra numa mufla a 600 °C (AOAC 923.03) e, finalmente, o teor de hidratos de carbono foi calculado por diferença de todos os parâmetros obtidos anteriormente. Em ambos, os resultados

foram expressos em g/100 g de peso seco. Os hidratos de carbono foram calculados por diferença, segundo a **Equação 1**.

#### **Equação 1 - Hidratos de carbono**

Hidratos de carbono g /100 g ps = 100 – (humidade + cinzas + proteínas + gordura total)

O valor energético foi calculado segundo o descrito pelo Regulamento (UE) nº 1169 (2011) e de acordo com a **Equação 2**.

#### **Equação 2. Valor energético.**

Energia (kcal /100 g ps) = 4 × (g proteína + g hidratos de carbono) + 9 × (g de gordura )

#### **4.2.2. Açúcares livres**

A determinação cromatográfica dos açúcares livres nas farinhas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI, Knauer, sistema Smartline 1000, Berlim, Alemanha), conforme descrito pelos autores Barros et al. (2013). A partir da amostra utilizada para extração de Soxhlet (no qual se retirou a fração lipídica), foi pesado aproximadamente 1 g de massa e adicionou-se 1 mL de solução de padrão interno (melezitose, 25 mg/mL).

Para realizar a extração adicionou-se à amostra 40 mL de etanol 80%, em banho-maria a 80 °C durante 1 hora e 30 min, com agitação intercalada a cada 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (Centrífuga refrigerada K24OR, Centurion, Sussex Ocidental, Reino Unido) durante 10 min a 3500 rpm, filtradas, e o sobrenadante transferido para um balão de vidro no qual se procedeu à evaporação do etanol a 50 °C sob pressão reduzida (Evaporador rotativo Büchi R-210, Flawil, Suíça). A água obtida após evaporação do sobrenadante, foi então submetida a um processo de deslipidificação, onde foi lavada três vezes sucessivas com 10 mL de éter etílico. As amostras foram colocadas a 40 °C para remoção do éter etílico residual, e o resíduo redissolvido em água destilada para aferido a 5 mL e, posteriormente, filtrado em filtros de nylon de 0,2 µm para vials para posterior análise do perfil em açúcares no sistema de HPLC.

O sistema de HPLC (Knauer, sistema Smartline) usado está equipado com um detector de RI (Knauer Smartline 2300) e uma coluna 100-5 NH<sub>2</sub> Eurospher (4,6 × 250 mm, 5 μm, Knauer). A fase móvel utilizada foi acetonitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v) com um caudal de 1 mL/min em modo isocrático. A identificação dos açúcares foi realizada através da comparação dos tempos de retenção relativos dos picos da amostra com padrões autênticos (frutose ( $y = 1,04x$ ,  $R^2 = 0,999$ ; LD = 0,05 mg/mL; LQ = 0,18 mg/mL); glucose ( $y = 0,935x$ ,  $R^2 = 0,999$ ; LD = 0,08 mg/mL; LQ = 0,25 mg/mL); e sacarose ( $y = 0,977x$ ,  $R^2 = 0,999$ ; LD = 0,06 mg/mL; LQ = 0,21 mg/mL)) e a quantificação realizada pela normalização interna da área do pico cromatográfico usando o pico da melezitose (PI) como padrão. Os resultados foram expressos em g por 100 g de peso seco da amostra.

#### 4.2.3. Ácidos orgânicos

A determinação cromatográfica do perfil em ácidos orgânicos foi realizada por cromatografia líquida ultra-rápida acoplada a um detector de diodos (UFLC-DAD; Shimadzu Cooperation, Kyoto, Japão) como previamente descrito por Barros et al. (2013).

Foram pesadas aproximadamente 1 g de massa de cada amostra seca para um gobelé protegido da luz (previamente envolto em papel de alumínio) e adicionou-se 25 mL de ácido metafosfórico (4,5%, v/v) numa concentração de 10 mg/mL, a uma temperatura ambiente de cerca de 25 °C. A mistura foi colocada sob agitação magnética durante 20 minutos e posteriormente filtrada para um tubo de ensaio de 20 mL. Para análise cromatográfica, as amostras foram filtradas para um vial âmbar (1,5 mL) através de filtro de nylon de 0,2 μm para posterior análise em UFLC. A separação dos compostos foi efetuada através de uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (250 mm x 4,6 mm, 5 μm, Phenomenex), termostaticada a 35 °C. A detecção ocorreu através de um detector de diodos (DAD) programado para adquirir os comprimentos de onda predefinidos de 215 nm e 245 nm. O solvente de eluição utilizado em modo isocrático foi o ácido sulfúrico (3,6 mM, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A identificação dos ácidos orgânicos e a respetiva quantificação foi determinada por comparação dos tempos de retenção e espectros UV com padrões comerciais. A quantificação foi realizada por comparação da área do pico no comprimento de onda programado com o padrão comercial correspondente, utilizando retas de calibração de 7 níveis: ácido oxálico ( $y = 10^6x + 231891$ ;  $R^2=0,9999$ , LD = 6,3 μg/mL; LQ = 20,8

$\mu\text{g/mL}$ ); ácido málico ( $y = 950041x + 6255,6$ ,  $R^2 = 0,9999$ ,  $LD = 15,9 \mu\text{g/mL}$ ;  $LQ = 59,9 \mu\text{g/mL}$ ); ácido cítrico ( $y = 10^5x - 10277$ ;  $R^2 = 0,9997$ ;  $LD = 0,11 \mu\text{g/mL}$ ;  $LQ = 0,34 \mu\text{g/mL}$ ). Os resultados foram expressos em g por 100 g de peso seco da amostra.

#### 4.2.4. Ácidos gordos

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização por chama (GC-FID, instrumento DANI modelo GC 1000, Milão, Itália), conforme descrito por Barros et al. (2013).

O extrato lipídico obtido após extração por Soxhlet (ver sub-título 4.3.1.) foi submetido a um processo de derivatização para obtenção de ácidos gordos passíveis de volatilização, denominados FAME (*Fatty acid methyl ester* – ésteres metílicos de ácidos gordos). Para isso, ao extrato lipídico foi adicionado 5 mL de uma solução de metanol/ácido sulfúrico/tolueno na proporção 2:1:1 (v/v/v), e colocado em banho-maria a 50 °C durante 12 horas sob agitação de 160 rotações por minuto (rpm). Após o qual, com o intuito de potencializar a separação das fases, foi adicionado 3 mL de água destilada e 3 mL de éter etílico no qual se dissolveram os FAME. Para eliminar qualquer resíduo de água, o sobrenadante foi colocado em contacto com uma pequena porção de sulfato de sódio anidro, recuperando-se a amostra e filtrando-a (filtro de nylon 0,2  $\mu\text{m}$ ) para um vial com tampa de membrana de teflon.

A identificação do perfil de ácidos gordos foi feita através de um sistema GC (Modelo DANI GC 1000) equipado com um injetor *split/splitless*, detetor de ionização de chama (FID, 260 °C) e uma coluna Macherey Nagel (30 m  $\times$  0,32 mm  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$  d<sub>f</sub>). O forno foi programado com os seguintes parâmetros: a temperatura inicial da coluna foi 100 °C, durante 2 min; em seguida, aumentou-se a temperatura a 10 °C/min até 140 °C, 3 °C/min até 190 °C, 30 °C/min até 260 °C durante 2 min. O hidrogénio (gás de transporte) tinha um caudal de 4,0 mL/min (0,61 bar), medido a 50 °C. A injeção split (1:50) foi realizada a 250 °C. Para cada análise injetou-se 1  $\mu\text{L}$  da amostra.

A identificação de ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos da mistura padrão de 37 FAMES e das amostras. Para o processamento dos resultados utilizou-se o programa software Clarity 4.0.1.7 (DataApex, Podohradka,

República Checa), tendo sido expressos os resultados em percentagem relativa (%) de cada ácido gordo detetado.

### **4.3. Avaliação do potencial bioativo e perfil em compostos fenólicos**

#### **4.3.1. Preparação dos extratos hidroetanólicos**

Os extratos hidroetanólicos foram preparados usando 1 g de amostra seca com 30 mL de uma solução etanol:água (80:20, v/v), em agitação magnética durante 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, filtrou-se usando papel de filtro Whatman nº 4 e repetiu-se a extração da amostra usando o mesmo volume de solvente e ao mesmo tempo de agitação. Os extratos combinados foram evaporados através de um evaporador rotativo (Buchi, série 3000, Suíça), até à evaporação total do etanol sob vácuo a 50 °C. A fase aquosa obtida foi congelada e liofilizada para posterior análise da sua capacidade bioativa e perfil fenólico.

#### **4.3.2. Determinação do perfil em compostos fenólicos**

Para a análise cromatográfica foi utilizado um sistema Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) equipado com uma bomba quaternária, um injetor automático (a 5 °C), um degasificador e um compartimento de coluna com termóstato automatizado. A deteção dos compostos foi efetuada com detetor de díodos (DAD), usando os comprimentos de onda de 280 nm, 330 nm e 370 nm. Para a separação dos compostos, utilizou-se uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 de fase reversa C<sub>18</sub> (4,6 x 150 mm, 3 µm; Milford, EUA) termostaticada a 35 °C. A fase móvel utilizada foi isocrático: 10% a 15% B até 5 min, 15-20% B até 5 min, 20-25% B 10 min, 25-35% B 10 min, 35-50% B 10 min e reequilíbrio da coluna por 10 min, sendo definida uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. O sistema de HPLC descrito encontrava-se também interligado a um espectrómetro de massa (MS). A deteção de MS foi feita utilizando um espectrómetro de massa Ion Trap Linear LTQ XL (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA), equipada com uma fonte ESI (fonte de ionização electrospray). O gás de arraste utilizado foi azoto (50 psi). O sistema trabalhou com uma voltagem de spray de 5 kV, a uma temperatura inicial de 325 °C e tensão capilar de -20 V. A voltagem do *tube lens offset* foi mantida a -66 V. Os espetros foram gravados em modo de ião negativo entre

100 e 1500  $m/z$ . A energia de colisão utilizada foi de 35 (unidades arbitrárias). Os dados foram recolhidos e analisados utilizando o programa Xcalibur® (Thermo Finnigan, San Jose, CA, EUA).

Para a identificação dos compostos procedeu-se à comparação dos dados obtidos (tempos de retenção, espectros UV-Vis e espectros de massa) com dados disponíveis na literatura e, quando disponíveis, com os padrões. Para análise quantitativa, obtiveram-se as curvas de calibração por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas, baseadas nos sinais UV-Vis e utilizando o comprimento de onda máximo de absorção de cada composto padrão: ácido cafeico ( $y = 388,345x + 406,369$ ,  $R^2 = 0.9939$ , LD = 0,78  $\mu\text{g/mL}$ ; LQ = 1,97  $\mu\text{g/mL}$ ), apigenina-6-*C*-glucósido ( $y = 107,025x + 61,531$ ,  $R^2 = 0.9989$ , LD = 0,19  $\mu\text{g/mL}$ ; LQ = 0,63  $\mu\text{g/mL}$ ), catequina ( $y = 84,950x - 23,200$ ,  $R^2 = 0.999$ , LD = 0,17  $\mu\text{g/mL}$ ; LQ = 0,68  $\mu\text{g/mL}$ ) e quercetina-3-*O*-glucósido ( $y = 34,843x - 160,173$ ,  $R^2 = 0.9998$ , LD = 0,21  $\mu\text{g/mL}$ ; LQ = 0,71  $\mu\text{g/mL}$ ). Nos casos em que não se verificou disponibilidade de padrões para os respetivos compostos, a quantificação foi feita através de curvas de calibração de compostos do mesmo grupo fenólico. Os resultados foram expressos em mg de composto por mg/g de extrato.

#### **4.3.3. Avaliação da atividade antioxidante**

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos foi realizada através de dois métodos distintos: Inibição da peroxidação lipídica através de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA).

Na análise de TBARS avalia-se a capacidade do extrato atuar contra os oxidantes presentes na fração lipídica das células de cérebro de porco (Martins et al., 2016), por sua vez, no ensaio OxHLIA, avalia-se a capacidade do extrato penetrar nas membranas dos eritrócitos de ovelha de forma a neutralizar os oxidantes responsáveis pela sua destruição (Takebayashi, et al., 2012).

##### ***4.3.3.1. Inibição da peroxidação lipídica em tecidos cerebrais de porco através da formação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)***

Para a análise da atividade antioxidante através do método TBARS, utilizou-se o protocolo descrito por Sarmiento et al. (2015). Os extratos hidroetanólicos liofilizados

foram redissolvidos em etanol:água (80:20, v/v) para obtenção de uma solução mãe de 0,5 mg/mL, diluindo-se sucessivamente para obtenção de seis concentrações abaixo da mesma.

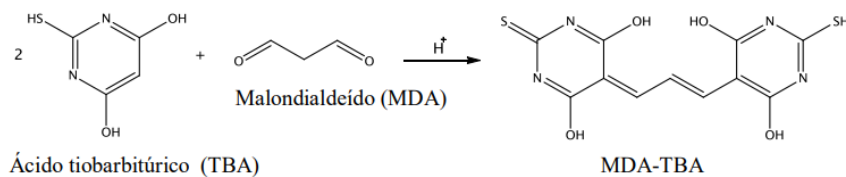
Paralelamente, foi preparada uma suspensão de cérebro de porco (*Sus scrofa*) no qual foi adicionado uma porção de cérebro juntamente com tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) numa proporção de 1:2 (m/v), centrifugando-se a mistura a 3500 rpm durante 10 min a uma temperatura de 10 °C para evitar a rancificação da mistura.

Em tubos eppendorf foi colocado 200 µL de cada uma das soluções de extrato hidroetanólico, às quais se adicionaram 100 µL de ácido ascórbico (0,1 mM), 100 µL de sulfato de ferro (FeSO<sub>4</sub> – 10 mM) e 100 µL do sobrenadante do homogeneizado de cérebro de porco e incubou-se à 37,5 °C durante 1 hora. Após incubação, foi adicionado 500 µL de ácido tricloroacético (28% m/v) para parar a reação e 380 µL de ácido tiobarbitúrico (2% m/v, TBA), e os tubos foram colocados em banho maria à 80 °C durante 20 minutos, de forma a promover a reação entre o TBA e o malondialdeído (**Figura 12**), (MDA – espécie reativa de oxigênio resultante da peroxidação lipídica que ocorre no tecido cerebral do porco). Posteriormente, centrifugou-se a mistura a 3500 rpm durante 5 min, para separar os resíduos do sobrenadante. A medição da intensidade da cor do complexo MDA – TBA fez-se a 532 nm em placa de poços de 300 µL. A percentagem de inibição da peroxidação lipídica foi calculada através da **Equação 3**.

**Equação 3.** Percentagem de inibição da peroxidação lipídica.

$$\% \text{ inibição da peroxidação lipídica} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

onde A e B dizem respeito à absorvância do controlo (água) e da solução de extrato, respetivamente. A concentração de extrato correspondente a 50% de inibição da peroxidação lipídica (IC<sub>50</sub>) foi calculada a partir do gráfico da percentagem de inibição da formação de TBARS em função da concentração de extrato. Como controlo positivo foi usado o trolox e os resultados foram expressos em µg/mL.



**Figura 12** - Reacção de MDA e TBA na formação de TBARS (Antolovich et al., 2002).

#### 4.3.3.2. Inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA)

A atividade anti-hemolítica foi avaliada através do ensaio de OxHLIA previamente descrito por Lockowandt et al. (2019). Alíquotas de sangue de ovelha foram recolhidas em animais saudáveis e centrifugadas a 1000 rpm durante 5 min a uma temperatura de 10 °C para obtenção dos eritrócitos (o plasma e a camada leuco-plaquetária foram descartados). Os eritrócitos foram primeiramente lavados com NaCl (150 mM) e três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4). O sedimento de eritrócito foi depois ressuspensão em PBS 2,8% (v/v).

Numa placa de 48 poços de fundo plano, 200 µL da solução de eritrócitos foram misturados com 400 µL de solução PBS (controlo negativo), de amostras antioxidantes dissolvidas em PBS ou água (para hemólise completa). O Trolox foi usado como controlo positivo. Realizou-se uma pré-incubação das placas a 37 °C durante 10 min com agitação, adicionando-se em seguida dicloridrato de 2,2'-Azobis (2- amidinopropano) (AAPH, 160 mM em PBS, 200 µL) e incubando-se de seguida nas mesmas condições. A densidade ótica foi então medida a 690 nm em intervalos de 10 min por cerca de 400 min (Takebayashi, et al., 2012).

O cálculo da percentagem de população de eritrócitos que permanece intacta (P) foi calculada mediante **Equação 4**.

**Equação 4.** Percentagem de população de eritrócitos intactos.

$$P (\%) = (S_t - CH_0 / S_0 - CH_0) \times 100$$

onde  $S_t$  e  $S_0$  correspondem a densidade ótica da amostra aos tempos  $t$  e 0 min, respetivamente, e  $CH_0$  é a densidade ótica da hemólise completa a 0 min. Os resultados

foram expressos como tempo de atraso da hemólise ( $\Delta t$ ), o qual foi calculado de acordo com a **Equação 5**.

**Equação 5.** Tempo de atraso da hemólise.

$$\Delta t \text{ (min)} = Ht_{50} \text{ (amostra)} - Ht_{50} \text{ (controle)}$$

onde  $Ht_{50}$  corresponde ao tempo hemolítico de 50% (min) obtido graficamente a partir da curva de hemólise de cada concentração de amostra de antioxidante. Os valores de  $\Delta t$  foram posteriormente correlacionados linearmente com as diferentes concentrações de amostra, a partir das quais foi calculada a concentração com capacidade de retardar a hemólise em 60 min ( $IC_{50}$  (60 min),  $\mu\text{g/mL}$ ).

#### **4.3.4. Avaliação da atividade antimicrobiana**

##### **4.3.4.1. Atividade antibacteriana**

Para a determinação da atividade antibacteriana (Carocho et al., 2015), três bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* - ATCC 11632; *Bacillus cereus* - isolado de alimentos; e *Listeria monocytogenes* - NCTC 7973) e três bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* - ATCC 25922; *Salmonella typhimurium* - ATCC 13311; e *Enterobacter cloacae* -isolado clínico) foram estudadas. As seis estirpes de bactérias foram adquiridas pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Investigação Biológica “Siniša Stanković” da Universidade de Belgrado na Sérvia. Usando o método de microdiluição, foi determinada a concentrações mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) para cada bactéria sob cada extrato.

A concentração das culturas bacterianas foi ajustada espectrofotometricamente a 625 nm até uma concentração de  $1 \times 10^5$  UFC/mL. Os inóculos diluídos foram cultivadas em meio sólido para verificar a ausência de contaminação. As diferentes diluições do extrato hidroetanólico foram pipetadas para uma placa de poços contendo 100  $\mu\text{L}$  de caldo de soja tríptico (TSB) e, em seguida, adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de inóculo. Incubaram-se as microplacas por 24 h a uma temperatura de 37 °C.

Para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI - menor concentração que produziu uma inibição significativa (em torno de 50%) do crescimento da bactéria

em comparação com o controle positivo) foram adicionados 40 µL de cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT) (0,2 mg/mL) e incubou-se a 37 °C durante 30 min. As concentrações mínimas inibitórias obtidas no teste de suscetibilidade de várias bactérias ao extrato foram determinadas também por um ensaio colorimétrico de viabilidade microbiana baseado na redução da cor do INT e comparado com um controle positivo para cada estirpe bacteriana.

A concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada por subcultura em série, colocando 10 µL de cada poço que não apresentou mudança de cor em 100 µL de TSB. A menor concentração que não apresentou crescimento após essa subcultura foi considerada como a CMB. Os compostos E211 (benzoato de sódio) e E224 (metabissulfato de potássio), ambos usados como aditivos alimentares, foram os controles positivos, e o dimetilsulfóxido (DMSO, 5%) usado como controle negativo. Os resultados de CMI e CMB foram expressos em mg por mL.

#### **4.3.4.2. Atividade antifúngica**

Para a determinação da atividade antifúngica (Pires et al., 2018), seis estirpes fúngicas (*Aspergillus fumigatus*- isolado humano, *Aspergillus niger* - ATCC 6275, *Aspergillus versicolor* - ATCC 11730, *Penicillium funiculoicula* - ATCC 36839, *Penicillium verrucosum var. cyclopium* - isolado de alimentos e *Trichoderma viride* AMI 5061) foram utilizadas. Dois conservantes sintéticos amplamente utilizados também foram analisados contra esses contaminantes, nomeados benzoato de sódio (E211) e metabissulfato de potássio (E224), para confirmar a sensibilidade dos microrganismos a esses conservantes artificiais conhecidos. Os fungos foram adquiridos pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Investigação Biológica “Siniša Stanković” na Universidade de Belgrado na Sérvia e mantidos em meio malte ágar (MA), armazenados a 4 °C e sub-cultivadas uma vez por mês. Os esporos fúngicos foram lavados da superfície das placas de ágar com solução salina estéril a 0,85 % contendo Tween 80 a 0,1 % (v/v). A suspensão de esporos foi ajustada com uma solução salina estéril para uma concentração de aproximadamente  $1,0 \times 10^5$  num volume final de 100 µL por poço. Os inóculos foram armazenados a 4 °C. As diluições dos inóculos foram cultivadas em MA sólido para verificar a ausência de contaminação do inóculo.

Através da técnica de diluição sucessivas em microplacas de 96 poços, determinou-se a concentração mínima inibitória (CMI). Adicionou-se ao meio de malte com o inóculo fúngico a amostra de extrato e as microplacas foram incubadas durante 72 h a uma temperatura de 28 °C. As concentrações mais baixas sem crescimento visível (usando um microscópio binocular) foram definidas como CMI. As concentrações mínimas fungicidas (CMFs) foram determinadas por subcultura em série de 2 µL de cada poço que não apresentou mudança de cor, em microplacas contendo 100 µL de caldo de malte por poço e posterior incubadas durante 72 h a 28 °C. A menor concentração sem crescimento visível foi definida como CMF, indicando 99,5% de morte do inóculo original. Os compostos E211 (benzoato de sódio) e E224 (metabissulfito de potássio), ambos usados como aditivos alimentares, foram os controlos positivos, e o dimetilsulfóxido (DMSO, 5%) usado como controlo negativo. Os resultados de CMI e CMF foram expressos em mg por mL.

#### 4.3.5. Citotoxicidade

No sentido de se avaliar o potencial citotóxico associado aos extratos hidroetanólicos, realizou-se o ensaio da sulforrodamina B (SRB), previamente descrito por Barros et al. (2013).

Foram utilizadas quatro linhas celulares tumorais, nomeadamente MCF-7 (carcinoma da mama), AGS (adenocarcinoma gástrico), NCI-H460 (carcinoma de pulmão) e CaCo (adenocarcinoma colorretal), obtidas no DMSMZ – Leibniz – Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e todas elas mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL), componentes necessários para o seu crescimento. Os frascos de cultura foram mantidos numa incubadora a 37°C e com 5% de CO<sub>2</sub>, sob uma atmosfera húmida. As células foram utilizadas apenas quando apresentavam 70 a 80% de confluência.

Uma massa conhecida de cada um dos extratos (8 mg) foi dissolvida em DMSO (500 µL) e H<sub>2</sub>O (500 µL), foram assim obtidas soluções stock com uma concentração de 8 mg/mL, a partir das quais se procedeu a diluições sucessivas obtendo as concentrações a testar (0,125 - 8 mg/mL). Uma alíquota (190 µL) da suspensão celular de cada uma das linhas testadas com uma concentração celular de 5x10<sup>4</sup> células/mL, foi incubada com uma

alíquota de cada uma das concentrações dos diferentes extratos (10 µL) em microplacas de 96 poços durante 48 horas. O intervalo de concentrações testadas foi de 6,25 – 400 µg/mL.

Após a incubação, prosseguiu-se para a fixação das células: foi adicionado TCA (10% m/v; 100 µL) previamente refrigerado e as placas foram incubadas 1 hora a 4°C, foram lavadas com água deionizada e, após secagem, foi adicionada uma solução de SRB (0,057%, m/v; 100 µL), foram deixadas a repousar à temperatura ambiente durante 30 minutos. Para remoção da SRB não aderida, as placas foram lavadas três vezes com uma solução de ácido acético (1% v/v) e colocadas a secar. Por fim, a SRB aderida foi solubilizada com Tris (10 mM, 200 µL) e foi lida a absorvância a um comprimento de onda de 540 nm no leitor de microplacas Biotek ELX800. Os resultados encontram-se expressos em termos da concentração de extrato com capacidade para inibir o crescimento celular em 50% - GI<sub>50</sub>. Como controlo positivo foi utilizada a elipticina. Todos estes processos e operações foram efetuados em ambiente asséptico numa câmara de fluxo laminar vertical (TLStar, AV-30/70).

#### 4.3.6. Hepatotoxicidade

Foram utilizadas duas culturas de células normais: de fígado de porco (PLP2) e de rim de macaco (VERO) com o objetivo de avaliar a citotoxicidade associada aos extratos em células não tumorais. A preparação destas culturas celulares: os tecidos foram lavados com uma solução salina equilibrada de Hank (HBSS), contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e foram obtidos explantes de 1x1 mm<sup>3</sup>. Os explantes foram colocados em frascos de 25 cm<sup>2</sup> contendo DMEM suplementado com SFB (10%), aminoácidos não essenciais (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL), e foram incubados numa incubadora a 37°C e com 5% de CO<sub>2</sub>, com atmosfera humidificada. No sentido de assegurar o crescimento celular, o qual foi acompanhado pela observação no microscópio com contraste de fase, a cada dois dias foi renovado o meio de cultura. As células foram sub-cultivadas e plaqueadas numa microplaca de 96 poços, de forma a se obter uma densidade de 1,0 x 10<sup>4</sup> células/poço.

As diluições utilizadas para avaliar a hepatotoxicidade nestas culturas primárias de células não tumorais foram as mesmas que se encontram descritas na **Seção 4.3.5**. Também para a PLP2 e VERO os resultados são expressos em valores de concentração

de extrato que inibe em 50% o crescimento celular –  $GI_{50}$ . Como controlo positivo foi utilizada a Elipticina.

#### **4.3.7. Atividade anti-inflamatória**

Para avaliar a atividade anti-inflamatória os extratos foram dissolvidos em DMSO (500  $\mu$ L) e em H<sub>2</sub>O (500  $\mu$ L), foram assim obtidas soluções stock com uma concentração de 8 mg/mL, a partir das quais se procedeu a diluições sucessivas obtendo as concentrações a testar (0,125 - 8 mg/mL).

A linha celular de macrófagos de rato RAW 264.7, obtidas no DSMZ – Leibniz – Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, foi cultivada em meio DMEM, suplementada com soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor (10%), glutamina e antibióticos, e mantida numa incubadora a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> e sob uma atmosfera húmida.

As células foram destacadas com um raspador de células. Uma alíquota da suspensão celular de macrófagos (300  $\mu$ L) com uma densidade celular de  $5 \times 10^5$  células/mL e com uma proporção de células mortas inferior a 5% de acordo com o teste de exclusão do azul de Tripano, foi colocada em cada poço. A microplaca foi incubada durante 24 horas na incubadora com as condições anteriormente indicadas de forma a permitir uma adequada aderência e multiplicação das células. Após esse período as células foram tratadas com as diferentes concentrações de extrato (15  $\mu$ L, 0,125 – 8 mg/mL) e incubadas durante uma hora, sendo que o intervalo de concentrações testadas foi de 6,25 – 400  $\mu$ g/mL. Procedeu-se à estimulação com a adição de 30  $\mu$ L da solução de lipossacarídeo - LPS (1 mg/mL) e incubou-se durante mais 24 horas. Foi utilizado como controlo positivo dexametasona (50 nM) e como controlo negativo, as amostras na ausência de LPS.

A quantificação de óxido nítrico foi feita através da utilização de um kit do sistema de reagentes de Griess (soluções de nitrofenamida, etilenodiamina e nitrito) e através da curva de calibração de nitrito (nitrito de sódio 100 nM a 1,6 nM) preparada numa placa de 96 poços. O óxido nítrico produzido foi determinado através da leitura das absorvâncias a 540 nm (leitor de microplacas ELX800 Biotek, Bio-Tek Instruments, Inc.,

Winooski, VT, EUA) e pela comparação com a reta de calibração do padrão ( $y = 0,0063x + 0,1368$ ,  $R^2 = 0,9989$ ).

Os resultados foram calculados através da representação gráfica da percentagem de inibição da produção de óxido nítrico versus a concentração de amostra, e expressos relativamente à concentração de cada um dos extratos que provoca a inibição, em 50%, da produção de óxido nítrico – IC<sub>50</sub> (Sobral et al., 2016).

#### **4.4. Aplicação da farinha do mesocarpo de babaçu em produtos de panificação e pastelaria**

##### **4.4.1. Elaboração dos pães**

Os pães foram produzidos com o auxílio de uma panificadora doméstica Britânia Multipane 550W, usando a programação 1 para pães normais de 450 ou 600 g, na cor escura. O ciclo da programação consiste em 3 misturas e 3 descansos da massa antes da cozedura, levando cerca de 3 horas para ficar pronto. Após a cozedura, o pão foi removido da forma, deixado para arrefecer durante 1 hora até atingir a temperatura ambiente e embalado em sacos de polietileno para evitar a desidratação. As análises de propriedades físicas foram feitas até 3 horas após cozedura.

Os ingredientes foram pesados em balança de precisão e armazenados em recipientes de polipropileno (PP) livres de bisfenol, dentro de caixas plásticas transparentes até a sua utilização. Realizou-se duas bateladas para cada formulação apresentadas na **Tabela 2**. O código das formulações foi determinado da seguinte maneira: B, sigla para Bread (pão), seguido da percentagem de substituição da farinha de trigo pela farinha de mesocarpo de babaçu, logo, B0 – pão controlo, com 0% de farinha de babaçu, ou seja, composto por 100% de farinha de trigo; B12 – pão com 12% substituição da farinha de trigo pela farinha de MB, B18 – pão com 18% de substituição e B24 – pão com 24% de substituição. Após a elaboração, os produtos foram congelados e liofilizados para posteriores análises.

**Tabela 2** - Formulação para preparo dos pães (Autoria própria, 2020).

<b>Código</b>	<b>B0</b>	<b>B12</b>	<b>B18</b>	<b>B24</b>
<b>Ingredientes (g)</b>	<b>Controlo</b>	<b>12% de PANC</b>	<b>18% de PANC</b>	<b>24% de PANC</b>
Farinha de trigo	375	330	307,50	285
Mesocarpo de babaçu	-	45	67,50	90
Água	217,50	217,50	217,50	217,50
Óleo	33,75	33,75	33,75	33,75
Açúcar	22,50	22,50	22,50	22,50
Sal	7,50	7,50	7,50	7,50
Fermento biológico seco	7,50	7,50	7,50	7,50

#### 4.4.2. Elaboração dos waffles

Os waffles foram produzidos através de uma máquina para waffles da marca SilverCrest SWR 1000 A1 Waffle Maker. O ciclo de preparação dos waffles originou três unidades para cada formulação, levando cerca de 10 minutos cada para ficar pronto. Após a cozedura, os waffles foram removidos e arrefecidos até atingir a temperatura ambiente e embalados em sacos de polietileno para evitar a desidratação. As análises de propriedades físicas foram feitas até 3 horas após cozedura.

O código das formulações foi desenhado da mesma maneira que para os pães. W, sigla para waffle, seguido da percentagem de substituição da farinha de trigo pela farinha de mesocarpo de babaçu, logo, W0 – waffle controlo, com 0% de farinha de babaçu, ou seja, composto por 100% de farinha de trigo; W12 – waffle com 12% substituição da farinha de trigo pela farinha de MB, W18 – waffle com 18% de substituição e W24 – waffle com 24% de substituição. Os ingredientes foram pesados em balança de precisão e realizou-se duas bateladas para cada formulação, sendo elas apresentadas na **Tabela 3**. Após a elaboração, os produtos foram congelados e liofilizados para posteriores análises.

**Tabela 3** - Formulação para preparo dos waffles (Autoria própria, 2021).

<b>Código</b>	<b>W0</b>	<b>W12</b>	<b>W18</b>	<b>W24</b>
<b>Ingredientes (g)</b>	<b>Controlo</b>	<b>12% de PANC</b>	<b>18% de PANC</b>	<b>24% de PANC</b>
Farinha de trigo	83,00	73,04	68,06	63,08
Mesocarpo de babaçu	-	9,96	14,94	19,92
Margarina	66,70	66,70	66,70	66,70
Açúcar	50	50	50	50
Ovo ( $\geq 53$ g e $< 63$ g)	1	1	1	1

#### 4.5. Avaliação de parâmetros físicos dos pães e waffles desenvolvidos

##### 4.5.1. Volume específico

Para o cálculo do volume específico, determinou-se, em primeiro lugar, a massa dos produtos de panificação numa balança de precisão, expressa em gramas, e o volume mediante o método 72-10 da AACC (2000) referente ao deslocamento de sementes de painço (*Panicum miliaceum* L.). O método consiste no preenchimento de um recipiente transparente com sementes de painço. Em seguida, uma parte das sementes é substituída pela amostra e o volume ajustado até a borda e nivelado com auxílio de uma régua. As sementes restantes, correspondem ao volume deslocado pela amostra, são medidas em proveta graduada (100 mL), indicando o volume do produto, com expressão do resultado em mL. Por fim, dividiu-se o volume encontrado pela sua massa obtendo como resultado o volume específico dos pães e dos waffles (**Equação 6**).

**Equação 6.** Volume específico.

$$V_{\text{especifico}} \left( \frac{\text{mL}}{\text{g}} \right) = \frac{\text{Volume deslocado (mL)}}{P_{\text{produto}} (g)}$$

##### 4.5.2. Colorimetria

A análise de cores foi realizada com um espectrofotómetro CM-700d (Konica Minolta Sensing Americas, Osaka, Japão) onde se analisou a cor dos produtos de panificação e pastelaria com base na escala Hunter & Harold, 1987, onde  $L^*$  indica o nível de luminosidade, ou seja, para  $L^* = 0$ , preto e para  $L^* = 100$ , branco. O parâmetro  $a^*$  indica cor vermelho a cor verde ( $a^* = 60$ , vermelho e  $a^* = -60$ , verde), e  $b^*$  indica cor

amarelo a azul ( $b^* = 60$ , amarelo e  $b^* = -60$ , azul). Cada pão foi cortado verticalmente em fatias de aproximadamente 25 mm e foram realizadas no miolo do pão 4 medições por fatia, totalizando 12 medições para cada pão. Cada waffle foi cortado verticalmente em tiras de aproximadamente 25 mm e foram realizadas na superfície do waffle 4 medições por tira, totalizando 12 medições para cada waffle.

#### **4.5.3. Análise de textura**

Um analisador de textura TA.XT/plus (Stable Micro Systems, UK) acoplado a um computador com o software 'Texture Analysis' em 'Exponent Connect Lite' equipado com uma célula de carga de 5 kg e um probe cilíndrico de 36 mm de diâmetro foi utilizado para análise de textura tanto dos pães quanto para os waffles. A determinação da firmeza dos produtos foi mediante o Método AACC 74-09.01 (BRD2/P36), ou seja, por força de compressão. Em fatias verticais de aproximadamente 25 mm de largura, onde a sonda cilíndrica comprimiu a amostra em 40% da sua altura original, programado a uma velocidade de pré-teste de 1 mm/s, velocidade de teste: 1,7 mm/s, velocidade de pós-teste: 10 mm/s e uma distância de retorno de 30 mm.

A análise foi realizada no dia 0 (dia em que o produto foi elaborado), dia 3 e dia 7 a fim de analisar o seu envelhecimento e endurecimento através da textura. Os produtos foram armazenados em sacos de polietileno e em caixas plásticas transparentes para evitar a secagem.

#### **4.5.4. Avaliação das propriedades nutricionais, químicas e bioativas dos pães e waffles desenvolvidos.**

As amostras de pão e waffles foram congeladas, liofilizadas e reduzidas a um pó fino e seco para as análises posteriores. A humidade, teor de proteínas, gordura total, cinzas e hidratos de carbono foram determinados seguindo os métodos descritos anteriormente na **seção 4.3.1**. Para a determinação do perfil de açúcares livres, ácidos orgânicos e ácidos gordos, foram utilizados os métodos previamente descritos nos sub-títulos **4.3.2**, **4.3.3** e **4.3.4**, respectivamente.

Foram também preparados extratos hidroetanólicos como descritos anteriormente no sub-título **4.4.1**. para posteriores estudos do perfil fenólico (sub-título **4.4.2**) e

propriedades bioativas (sub-títulos **4.4.3.**, **4.4.4.**, **4.4.5.**, **4.4.6.** e **4.4.7.**) dos produtos desenvolvidos.

#### **4.6. Análise estatística**

Para cada análise com a amostra seca e respectivo extrato hidroetanólico, todos os ensaios foram realizados em triplicado, sendo os resultados expressos como valores médios  $\pm$  desvio padrão (SD). As diferenças significativas entre amostras foram analisadas através da análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste HSD de Tukey com  $\alpha = 0,05$  utilizando o IBM SPSS Statistics for Windows, Versão 23.0. (IBM Corp., Armonk, Nova York, EUA).

## Resultados e discussão



## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Caracterização do mesocarpo de babaçu

#### 5.1.1. Composição centesimal, açúcares, ácidos orgânicos e ácidos gordos

Os resultados da composição em macronutrientes e açúcares livres da farinha do mesocarpo de babaçu (MB) encontram-se descritos na **Tabela 4**. Como era expectável, a amostra em estudo apresentou níveis baixos de humidade,  $14,8 \pm 0,2$  g/100 g ps. Perante o resultado obtido, pode-se afirmar que a farinha utilizada neste estudo corresponde ao descrito na RDC nº 263/2005 da ANVISA, a qual preconiza a identidade e as características mínimas de qualidade das farinhas, apresentem teores de humidade máxima de 15%, considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controlo sanitário na área dos alimentos, visando a proteção à saúde da população. Ferreira e colaboradores (2010) ao pesquisarem a composição centesimal de farinha de mesocarpo de babaçu em dois municípios do Piauí encontraram teores de humidade de 13,91% e 15,00%. Esses autores ressaltam que, devido à diferença de localização geográfica das amostras, mesmo sendo oriundas do mesmo estado, as plantas que deram origem aos frutos, recebem influências climáticas e de cultivo que certamente contribuíram para diferenciar a composição dessas farinhas. Este parâmetro é considerado um dos principais responsáveis pelas alterações nas características nutricionais, organolépticas, físicas e microbiológicas das farinhas, sendo um fator de aceleração de reações químicas (Costa, et al., 2008), fazendo-se relevante para conservação das farinhas e tempo de prateleira estimado do produto final.

O teor de cinzas ( $1,13 \pm 0,12$  g/100 g ps) e de proteínas ( $1,38 \pm 0,01$  g/100 g ps) registrados por Maniglia e Tápia-Blácido (2016) são superiores aos analisados,  $0,9 \pm 0,2$  g/100 g ps e  $0,696 \pm 0,003$  g/100 g ps, respectivamente. Esse valor está de acordo com os percentuais estabelecidos pelo MAPA através da Instrução Normativa nº 8/2005, o qual estipula um valor máximo de 0,8% ps para a farinha classificada como tipo 1 ou também chamada de farinha especial, é uma das mais versáteis e a mais comum. Feita a partir da mistura de grãos de trigo fracos (pouco glúten) e fortes (muito glúten). Esse tipo é a mais utilizada no prepararo de pães (MAPA, 2005).

Os hidratos de carbono ( $97,75 \pm 0,02$  g/100 g ps) e as gorduras ( $0,6 \pm 0,2$  g/100 g ps) foram identificados como o macronutriente maioritário e minoritários,

respectivamente. O valor dos hidratos de carbono analisados neste trabalho é superior aos registados por Silva et al (2007) de  $72,20 \pm 1,05$  g/100 g ps e por Oliveira (2018) de  $80,66 \pm 0,4$  g/100 g ps, visto que é um dos principais grupos de substâncias alimentares a ser sintetizado na planta a partir de simples substâncias orgânicas. O teor de gorduras encontrado ( $0,6 \pm 0,2$  g/100 g ps) é maior que o obtido por Morales (2012), de 0,09 %, porém menor que os verificados por Silva et al (2007), Ferreira et al. (2010) e Cavalcante Neto (2012), respectivamente, 1,80 %, 3,94 % e 3,99 %. Quando comparado aos valores médios obtidos em dados de literatura para farinha de trigo (1,23 %) os valores da farinha de MB são inferiores. Pavlak e colaboradores (2007) concluíram que mudanças na composição da farinha de babaçu podem ocorrer devido às diferentes condições edafoclimáticas onde os frutos são colhidos e nas variações dos fatores genéticos entre os indivíduos, entre outras variáveis.

**Tabela 4** - Composição proximal, valor energético e açúcares livres da farinha proveniente do mesocarpo de babaçu (média  $\pm$  DP, n = 9).

Valor nutricional (g/100 g ps – peso seco)	MB
Humidade	$14,8 \pm 0,2$
Gordura total	$0,6 \pm 0,2$
Proteínas	$0,696 \pm 0,003$
Cinzas	$0,9 \pm 0,2$
Hidratos de carbono	$97,75 \pm 0,02$
Valor energético (kcal/100 g ps)	$399 \pm 1$
<b>Açúcares livres (g/100 g ps)</b>	
Frutose	$0,17 \pm 0,01$
Glucose	$0,11 \pm 0,02$
<b>Total de açúcares livres</b>	<b><math>0,28 \pm 0,03</math></b>

ps – peso seco; em cada linha letras diferentes significam diferenças significativas entre espécies ( $p < 0,05$ ).

Os açúcares (**Tabela 4**) intervêm em quase todos os processos no ciclo de vida das plantas, armazenando energia e fornecendo estruturas base para a síntese de outros compostos orgânicos (Shah, et al., 2019). No que respeita à composição em açúcares livres da farinha proveniente do mesocarpo de babaçu, foram identificados e quantificados dois monossacarídeos, a frutose ( $0,17 \pm 0,01$  g/100 g ps) e a glucose ( $0,11 \pm 0,02$  g/100 g ps). No qual sabe-se de antemão que a glucose é o monossacarídeo mais comumente encontrados em plantas.

A par dos açúcares, também os ácidos orgânicos (**Tabela 5**), para além de desempenharem um papel importante no metabolismo da planta, tais como a produção de energia, armazenamento de carbono, interações microbianas, entre outros. Estes ácidos são substâncias naturalmente presentes nas hortaliças e que exercem influência sobre certas características, tais como sabor, aroma e aparência (Calbo & Henz, 2007), mas também são responsáveis pela acidez, contribuindo assim para o sabor característico do fruto (Vallarino & Osorio, 2019). Foram identificados no total três ácidos orgânicos, os ácidos quínico, málico e cítrico. Com especial destaque para o ácido cítrico, encontrado em maior concentração na amostra MB ( $0,166 \pm 0,001$  g/100 g ps), pois é comumente utilizado na indústria de alimentos como acidificante.

Para além de afetarem as características organoléticas dos alimentos, os ácidos orgânicos podem interferir também na estabilidade microbiana, no valor nutricional e na aceitabilidade dos consumidores (Santos, 2013). O ácido quínico ( $0,132 \pm 0,001$  g/100 g ps) tem sido descrito como tendo muitas propriedades benéficas para a saúde do consumidor, entre as quais, efeitos anti-inflamatório e antioxidante (Jang et al., 2017), o que revela a importância do uso desta farinha na indústria alimentar e na sua aplicação em novos produtos que vão de encontro às preocupações do consumidor.

**Tabela 5** – Composição em ácidos orgânicos da farinha proveniente do mesocarpo de babaçu (média  $\pm$  DP, n = 9).

<b>Ácidos Orgânicos (g/100 g ps)</b>	
Ácido quínico	$0,132 \pm 0,001$
Ácido málico	$0,065 \pm 0,003$
Ácido cítrico	$0,166 \pm 0,001$
<b>Total de ácidos orgânicos</b>	<b><math>0,36 \pm 0,01</math></b>

ps – peso seco; em cada linha letras diferentes significam diferenças significativas entre espécies ( $p < 0,05$ ).

Foram identificados 5 ácidos gordos na amostra MB e encontram-se descritos na **Tabela 6**. A farinha de mesocarpo de babaçu revelou maiores teores em ácidos gordos saturados. Comparativamente ao descrito no estudo realizado pela EMBRABA (2001), no presente estudo foram ainda identificados os ácidos mirístico e pentadecílio. O ácido palmítico ( $59,1 \pm 0,3$  %) e o pentadecílio ( $3,44 \pm 0,03$  %) são os de maior e menor concentração encontrados, respectivamente.

**Tabela 6** - Composição em ácidos gordos da farinha proveniente do mesocarpo de babaçu (média ± DP, n = 9).

Ácidos gordos (%)	
Ácido mirístico (C14:0)	8,9 ± 0,1
Ácido pentadecílico (C15:0)	3,44 ± 0,03
Ácido palmítico (C16:0)	59,1 ± 0,3
Ácido esteárico (C18:0)	20,9 ± 0,3
Ácido oleico (C18:1n9c)	7,7 ± 0,1
<b>SFA</b>	<b>92,3 ± 0,2</b>
<b>MUFA</b>	<b>7,7 ± 0,1</b>

ps – peso seco; SFA – *saturated fatty acids* (ácidos gordos saturados); MUFA – *monounsaturated fatty acids* (ácidos gordos monoinsaturados). Em cada linha letras diferentes significam diferenças significativas entre espécies ( $p < 0,05$ ).

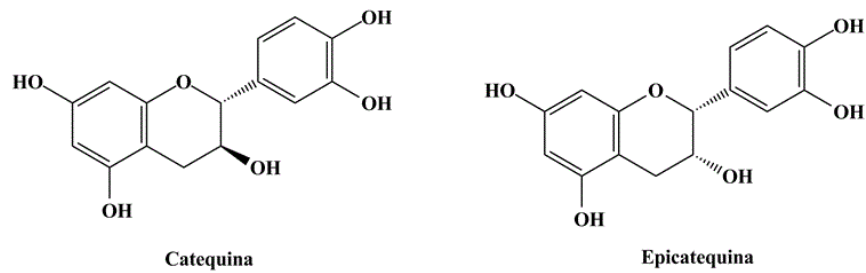
## 5.1.2. Propriedades Bioativas

### 5.1.1. Composição em compostos fenólicos

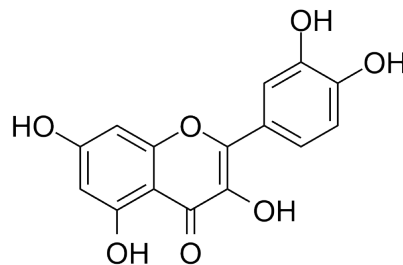
Os dados relativos à composição fenólica do extrato hidroetanólico da babaçu estão descritos na **Tabela 7**. Até à data da submissão desta tese, não foi possível encontrar referências de outros autores com a descrição fenólica individual desta amostra. Os picos na tabela estão sequenciados de acordo com o tempo de retenção dos compostos fenólicos encontrados também nas amostras de pão e waffles (**Tabela 15** e **Tabela 23**, respectivamente).

Na amostra de babaçu foi possível identificar nove compostos fenólicos, seis flavan-3-óis (derivados de catequina e epicatequina - **Figura 13**) e três flavonóides *O*-glicosilados derivados de quercetina (**Figura 14**). Os picos 2 e 4 ((+)-catequina e (-)-epicatequina, respetivamente) foram identificados por comparação do tempo de retenção, espectro de absorção máxima e dados de espectro de massa com padrões disponíveis no laboratório. Os picos 1, 5/7 e 8 foram identificados como dímero, tetrâmeros e pentâmeros de (Epi)catequina tipo  $\beta$ , respetivamente, de acordo com o previamente descrito por Melgar et al. (2018). O grupo dos flavan-3-óis representa 99% da composição fenólica da farinha de babaçu com uma concentração total de  $211 \pm 4$  mg/g extrato, devido sobretudo à presença do dímero de (Epi)catequina tipo  $\beta$  com um concentração de  $82 \pm 3$  mg/g extrato. Relativamente ao grupo dos flavonóides, os picos 10 ([M-H]<sup>-</sup> a  $m/z$  463), 12 ([M-

H]<sup>-</sup> a  $m/z$  477) e 13 ([M-H]<sup>-</sup> a  $m/z$  519) apresentaram um espectro MS<sup>2</sup> a  $m/z$  301 (aglicona de quercetina) com uma abundância de 100%, correspondendo a perdas de 162 u (hexose), 146 u (hexuronósido) e 42 u + 44 u + 162 u (malonil e hexose), respetivamente, permitindo assim uma identificação tentativa de quercetina-3-*O*-glucósido (identificado por comparação com padrão comercial), quercetina-*O*-hexuronósido e quercetina-*O*-malonil-hexósido.



**Figura 13** - Estrutura química da (+)-catequina e (-)-epicatequina (O mundo da química, 2020).



**Figura 14** - Estrutura química da quercetina (Clinisciences, 2020).

Em estudos anteriores à composição fenólica total, Vieira, Sousa e Lima (2011) assim como Maniglia e Tapia-Blácido (2016) verificaram um teor total de compostos fenólicos de  $98,31 \pm 2,30$  mg de equivalentes de ácido gálico/100 g de amostra para o extrato alcoólico de mesocarpo de babaçu, mas que não é passível de comparação com o presente estudo.

**Tabela 7** - Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do ultravioleta ( $\lambda_{\text{máx}}$ ), dados de espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação (mg/g extrato) dos compostos fenólicos presentes em extratos hidroetanólicos da farinha de babaçu (média  $\pm$  DP).

Pico	Tr (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	[M-H] <sup>+</sup> (m/z)	Identificação Tentativa	Quantificação (mg/g extrato)
1	4,08	280	577	Dímero de (Epi)catequina tipo $\beta$	82 $\pm$ 3
2	5,76	280	289	(+)-Catequina	36,2 $\pm$ 0,1
4	7,83	280	289	(-)-Epicatequina	26,2 $\pm$ 0,3
5	9,12	283	1153	Tetramero de (Epi)catequina tipo $\beta$	22 $\pm$ 1
7	10,49	283	1153	Tetramero de (Epi)catequina tipo $\beta$	20 $\pm$ 1
8	12,44	283	1441	Pentámero de (Epi)catequina tipo $\beta$	24 $\pm$ 1
10	17,07	334	463	Quercetina-3-O-glucósido	0,600 $\pm$ 0,001
12	21,15	345	477	Quercetina-O-hexuronósido	0,54 $\pm$ 0,01
13	24,52	334	519	Quercetina-O-malonil-hexósido	0,497 $\pm$ 0,001
<b>Compostos fenólicos Totais</b>					<b>213 <math>\pm</math> 4</b>
<b>Flavan-3-óis Totais</b>					<b>211 <math>\pm</math> 4</b>
<b>Flavonóis Totais</b>					<b>1,64 <math>\pm</math> 0,01</b>

MS<sup>2</sup> (m/z): Pico 1 - 451(100), 575(40),425(5),407(5),289(5),287(10);  
 Pico 2 - 325(20), 289 (100), 245(100), 205(41); Pico 4 - 325(20), 289 (100), 245(100), 205(41);  
 Pico 5 - 865(68),713(20),695(2),577(22),575(40),425(5),407(5),289(5),287(10);  
 Pico 7-865(68),713(20),695(2),577(22),575(40),425(5),407(5),289(5),287(10);  
 Pico 8- 1153(12),865(68),713(20), 695(2),577(22),575(40),425(5),407(5),289(5),287(10);  
 Pico 10 - 301(100); Pico 12 - 301(100); e Pico 13 - 477(32),301(100).

### 5.1.1.1. Atividade antioxidante e citotoxicidade

Os resultados da atividade antioxidante, atividade antitumoral, hepatotoxicidade e atividade anti-inflamatória para o extrato da farinha de mesocarpo de babaçu estão apresentados na **Tabela 8** e são expressos em IC<sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) e GI<sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ). Na literatura encontram-se descritos vários ensaios baseados em diferentes mecanismos para a avaliação da capacidade antioxidante de alimentos e compostos químicos. Neste estudo, aplicaram-se dois métodos distintos: inibição da peroxidação lipídica em tecidos cerebrais de porco através da formação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e inibição da hemólise oxidativa em eritrócitos isolados do sangue de ovelha (OxHLIA). Nos resultados descritos, encontra-se a concentração do extrato hidroetanólico necessário para inibir 50% da peroxidação lipídica no tecido lipídico do cérebro de porco e para proteger 50% da população de eritrócitos (provenientes de sangue de ovelha) da ação hemolítica causada pelo agente oxidante. Assim, quanto menor a concentração de IC<sub>50</sub>,

maior a capacidade de inibição da formação de TBARS e maior a ação anti-hemolítica das amostras.

O extrato hidroetanólico testado revela alta capacidade antioxidante ( $0,0131 \pm 0,001 \mu\text{g/mL}$ ) para inibir a peroxidação lipídica, apresentando um  $\text{IC}_{50}$  99,65% mais eficaz em comparação com o controlo positivo utilizado neste ensaio (Trolox:  $3,7 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$ ). Maniglia e Tapia-Blácido (2016) registaram um valor de  $63,4 \pm 1,5\%$  de atividade antioxidante para o extrato de babaçu, no entanto este resultado foi obtido pelo ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). No ensaio OxHLIA a amostra de mesocarpo de babaçu também revelou uma atividade promissora ( $5,4 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ), pois comparando com o controlo positivo (Trolox;  $21,8 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ ) a amostra é 75% mais eficaz, apresentando alta capacidade anti-hemolítica. A atividade antioxidante da farinha de mesocarpo de babaçu poderá estar correlacionada com a presença de compostos fenólicos, conforme previamente descrito por Vieira, Sousa e Lima (2011).

**Tabela 8** - Atividade antioxidante, antitumoral, hepatotoxicidade e anti-inflamatória do extrato hidroetanólicos da farinha proveniente do mesocarpo de babaçu (média  $\pm$  DP, n = 9).

<b>Atividade antioxidante</b>	<b>IC<sub>50</sub> (μg/mL)</b>	<b>Trolox (μg/mL)</b>
TBARS	$0,0131 \pm 0,001$	$3,7 \pm 0,5$
OxHLIA	$5,4 \pm 0,1$	$21,8 \pm 0,2$
<b>Atividade antitumoral</b>	<b>GI<sub>50</sub> (μg/mL)</b>	<b>Elipticina (μg/mL)</b>
AGS (adenocarcinoma gástrico)	$23 \pm 2$	$1,23 \pm 0,03$
CaCo (adenocarcinoma colorretal)	$17 \pm 2$	$1,21 \pm 0,02$
MCF-7 (carcinoma de mama)	$44 \pm 4$	$1,02 \pm 0,02$
NCI-H460 (carcinoma de pulmão)	$27,7 \pm 0,4$	$1,01 \pm 0,01$
<b>Hepatotoxicidade</b>		<b>Elipticina (μg/mL)</b>
PLP2	$18,8 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,1$
VERO	$204 \pm 13$	$1,4 \pm 0,1$
<b>Atividade anti-inflamatória</b>		<b>Dexametasona (μg/mL)</b>
RAW 264.7	$> 400$	$6,3 \pm 0,4$

Os valores de  $\text{IC}_{50}$  correspondem à concentração do extrato que atinge 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância na redução do ensaio de potência. Os resultados de citotoxicidade foram expressos em valores de  $\text{GI}_{50}$ : correspondendo a concentração de amostra necessária para realizar a inibição do crescimento em 50% sob células tumorais humanas ou em cultura primária de células de fígado de porco (PLP2) e rim de macaco (VERO).

No que diz respeito aos resultados da atividade antitumoral nas diversas linhas celulares cancerígenas estudadas (MCF-7, NCI-H460, CaCo e AGS), o extrato hidroetanólico do mesocarpo de babaçu apresentou resultados positivos para a inibição de todas as linhas celulares, sendo as linhas de adenocarcinoma colorretal – CaCo ( $17 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ ) e adenocarcinoma gástrico – AGS ( $23 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ ) as que apresentaram mais baixa concentração de amostra necessária para inibir o crescimento das células em 50%.

Rennó e colaboradores (2008) avaliaram a citotoxicidade do extrato etanólico do mesocarpo de babaçu contra linhas leucêmicas humanas, de cancro de mama (MCF-7), linhas de fibroblastos de camundongo (3T3-L1) e linfócitos humanos de sangue periférico. O extrato promoveu a diminuição da viabilidade em todas as linhas celulares testadas de maneira dose-dependente, verificando também danos sobre a morfologia das células cancerígenas. Estes resultados, em conjunto com os obtidos neste estudo, demonstram que o extrato hidroetanólico do mesocarpo de babaçu pode ser uma promissora fonte de novos agentes antitumorais.

Contudo, observou-se igualmente a inibição de células saudáveis das linhas celulares PLP2 e VERO, o que indica que este extrato apresenta alguma hepatotoxicidade. No entanto, é de referir que o valor de  $GI_{50}$  é bastante superior (cerca de 7x) para a linha celular VERO comparativamente às linhas celulares tumorais. Assim, seriam necessários estudos adicionais, possivelmente envolvendo o fracionamento e identificação dos compostos ativos, para entender o potencial *versus* a toxicidade deste extrato.

Ressalta-se ainda que o resultado de atividade anti-inflamatória testadas na linha celular de macrófagos de rato RAW 264.7, apresentou resultado com concentração de  $GI_{50} > 400$ , ou seja, o extrato hidroetanólico do mesocarpo de babaçu não apresentou atividade anti-inflamatória. No entanto, num estudo realizado por Maia e Rao (1989), Da Silva e Parente (2001), as propriedades anti-inflamatórias e analgésicas do mesocarpo de babaçu foram confirmadas experimentalmente utilizando um extrato de clorofórmio dos frutos secos.

#### **5.1.1.2. Atividade antimicrobiana**

O extrato hidroetanólico do mesocarpo de babaçu foi submetido à análise da atividade antimicrobiana em doze estirpes no total, com a finalidade de determinar a potencial atividade antibacteriana e antifúngica.

A atividade antibacteriana do extrato da farinha de mesocarpo de babaçu, foi testada contra um painel de seis bactérias, dentre as quais, três bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus*; *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) e três Gram-negativas (*Escherichia coli*; *Enterobacter cloacae* e *Salmonella typhimurium*). A **Tabela 9** apresenta os resultados obtidos para o extrato em Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) e estão expressos em mg/mL. A atividade antimicrobiana associada a amostra é maior quanto menor for o valor da concentração mínima inibitória (CMI), ou seja, é a mais baixa concentração de um produto responsável por limitar o crescimento visível de uma bactéria.

**Tabela 9** - Atividade antibacteriana (CMI e CMB em mg/mL) do extrato da farinha de mesocarpo de babaçu.

Amostra		<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>En. cloacae</i>
<b>MB</b>	CMI	0.5	0.06	0.5	1	0.5	0.25
	CMB	1	0.125	1	2	1	0.5
<b>E211</b>	CMI	4	0.5	1	1	1	2
	CMB	4	0.5	2	2	2	4
<b>E224</b>	CMI	1	2	0.5	0.5	1	0.5
	CMB	1	4	1	1	1	0.5

*B. cereus*: *Bacillus cereus*; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; *L. monocytogenes*: *Listeria monocytogenes*; *E. coli*: *Escherichia coli*; *En. Cloacae*: *Enterobacter cloacae*; *S. typhimurium*: *Salmonella typhimurium*. CMI: Concentração mínima inibitória; CMB: Concentração mínima bactericida; MB: mesocarpo de babaçu. Controlos positivos: E211 (benzoato de sódio) e E224 (metabissulfito de potássio).

O extrato de MB apresentou valores baixos de CMI e CMB para atividade antibacteriana, revelando por isso, grande potencial contra todas as estirpes bacterianas analisadas, especialmente por apresentar resultados inferiores quando comparados com os controlos positivos utilizados (E211 e E224). Sabe-se que quanto menores e quanto mais próximos forem os valores destas duas variáveis (CMI e CMB), mais potente será a atividade antibacteriana. Estes resultados são de extrema importância, pois os perigos biológicos, que incluem microrganismos e as suas toxinas, devem ser controlados rigorosamente no âmbito da segurança alimentar visto que o risco associado à sua ingestão pode causar efeitos adversos na saúde do consumidor, podendo inclusivamente levar à morte. Segundo o Center for Food Safety and Applied Nutrition e a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (European Food Safety Authority, EFSA) os microrganismos *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* estão frequentemente envolvidos em doenças de origem alimentar, e como pode-se observar o extrato do MB revelou-se altamente eficaz contra estas estirpes. No entanto, o maior

desempenho de inibição deu-se contra o microrganismo *Bacillus cereus* (CMI: 0,06 mg/mL), seguido do *Enterobacter cloacae* (CMI: 0,25 mg/mL). Num estudo efetuado por Barroqueiro e colaboradores (2016), relata que o MB revelou atividade antibacteriana com CMI de 32 mg/mL para a bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), valor muito superior ao encontrado neste presente estudo (CMI: 0,5 mg/mL). Num outro estudo realizado por Oliveira (2018), determinou-se qualitativamente a atividade antimicrobiana do extrato de MB contra bactérias patogénicas como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, apresentando capacidade de inibição pelo método de difusão de disco.

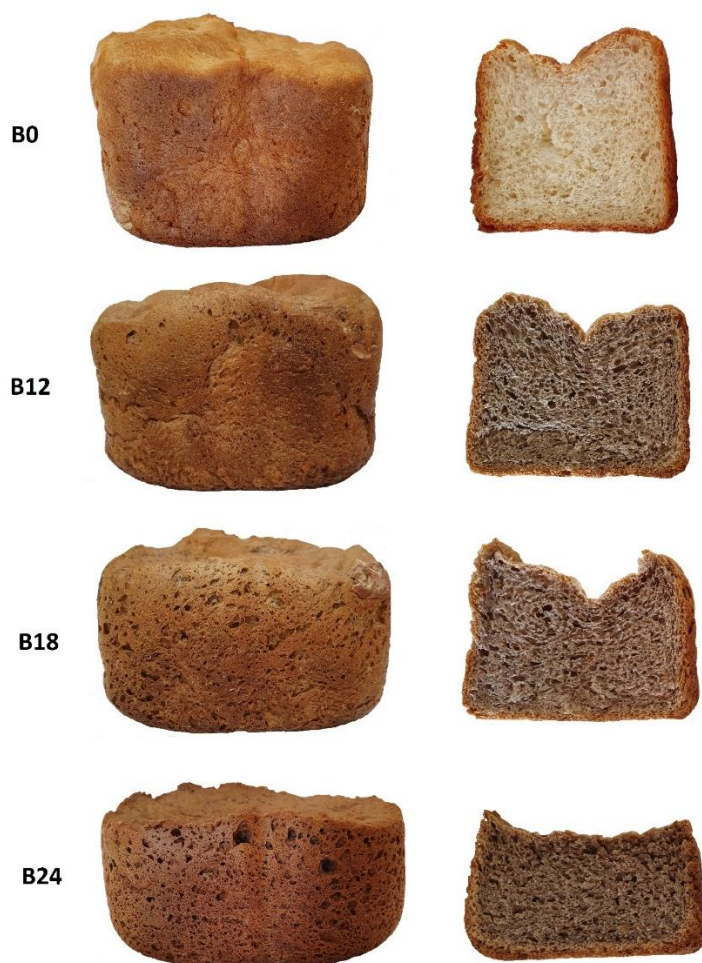
Os resultados obtidos no ensaio da atividade antifúngica não estão presentes em tabela, pois o extrato hidroetanólico da farinha de mesocarpo de babaçu não apresentou atividade até à concentração máxima testada (8 mg/mL). Significando isto, que o extrato de MB, não foi eficaz contra as estirpes fúngicas analisadas.

## 5.2. Caracterização dos produtos de panificação (pães)

### 5.2.1. Parâmetros físicos

Na **Figura 15** estão apresentadas as fotos dos pães produzidos com 100% de farinha de trigo (B0 - controlo) e as substituições de 12% (B12), 18% (B18) e 24% (B24) da farinha trigo pela farinha de mesocarpo de babaçu, os resultados das análises dos parâmetros físicos estão apresentados na **Tabela 10**.

Em relação aos parâmetros físicos avaliou-se o peso (g), volume (mL) e volume específico (ml/g), os valores encontrados mostram que a aplicação da farinha de PANC influenciam diretamente no volume dos pães e no volume específico (VE). Embora os valores de peso não demonstrem tanta variação, os valores de volume específico revelaram grandes diferenças. O volume específico é a medida usada para verificar a capacidade da massa de expandir e reter o gás dentro dela durante a cozedura (Evangelho, et al., 2012). O VE do pão controlo (100% farinha de trigo) foi de  $4,44 \pm 0,02$  mL/g e conforme aumento das percentagens da farinha de mesocarpo de babaçu os valores decresceram. O pão com a maior substituição de 24% (B24) obteve um VE de  $2,7 \pm 0,1$  mL/g, ou seja, houve um decréscimo de aproximadamente 60% em relação ao pão controlo (B0).



**Figura 15** - Pães e fatias em suas respectivas substituições da farinha de trigo pela farinha de mesocarpo de babaçu (Autoria própria, 2020).

De acordo com Oliveira (2008), um alto teor de fibras na farinha utilizada na produção de pães, poderá reduzir o volume do mesmo, devido ao aumento da absorção de água e menor tolerância à fermentação. Isto deve-se ao facto de que as fibras afetam de forma negativa o aprisionamento dos gases que são produzidos durante a fermentação, os quais auxiliam no maior volume do pão (Vinhilva, et al., 2011).

**Tabela 10** – Parâmetros físicos dos pães formulados (média  $\pm$  DP, n = 9).

Parâmetros físicos	B0	B12	B18	B24
Peso (g)	547 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	555,9 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	546 $\pm$ 3 <sup>ac</sup>	543 $\pm$ 6 <sup>c</sup>
Volume (ml)	2431 $\pm$ 20 <sup>a</sup>	2166 $\pm$ 27 <sup>b</sup>	1810 $\pm$ 10 <sup>c</sup>	1443 $\pm$ 30 <sup>d</sup>
Volume específico (ml/g)	4,44 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	3,9 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	3,12 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	2,7 $\pm$ 0,1 <sup>d</sup>

Em cada linha letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ )

Existem diversos parâmetros que influenciam a qualidade do pão, entre eles, o nível de crescimento do pão, que é um dos fatores mais importantes em relação à qualidade, pois está diretamente ligado a parâmetros como aparência, textura e sabor do pão (Chen, et al., 2019). Alguns autores referem que a utilização de emulsificantes pode ajudar a estabilização da interface entre os gases e a massa e, por isso, não perder volume específico quando são utilizadas farinhas de alto teor em fibra ou compostos lipofílicos (Tebben, et al., 2018).

Os resultados das análises de textura apresentados na **Tabela 11** compreendem valores entre  $133 \pm 17$  a  $769 \pm 45$  N/cm<sup>2</sup> para o dia em que foram elaborados (Dia 0). Observa-se um aumento na firmeza dos pães com 18 e 24% de MB, onde a força de compressão aumentou em cerca de 53 e 82%, respectivamente, em comparação ao pão controle (B0). O pão com 12% de substituição não apresentou diferenças significativas em comparação com o pão B0 no dia em que foram elaborados. Este aumento da firmeza ocorre devido ao enfraquecimento do glúten, proveniente da farinha de trigo.

O trigo é o único cereal que possui glutenina e gliadina em quantidade suficiente para formar o glúten. O glúten é uma substância elástica, aderente, insolúvel em água e responsável pela estrutura dos pães. É formado pela hidratação dessas proteínas ligadas entre si e a outros componentes macromoleculares por meio de diferentes tipos de ligações químicas (Araújo, et al., 2008). Desta forma, o crescimento e a textura das massas são diretamente influenciados pela presença de glúten pois ele é o principal ingrediente responsável pela retenção dos gases oriundos da fermentação. No entanto a adição de farinhas sem glúten terá como consequência a diminuição da força do glúten, enfraquecendo a rede tridimensional que aprisiona o dióxido de carbono resultante dessa fermentação, que é responsável pela formação e crescimento da massa do pão, então quando o gás é perdido pela rede de glúten, que não tem estabilidade, haverá uma redução do volume do pão, bem como o aumento da firmeza do mesmo, pela compactação dos componentes estruturantes do pão. Isto posto, o aumento da dureza dos pães está relacionado a essa compactação de sua estrutura.

**Tabela 11** – Força de compressão e taxa de envelhecimento dos pães formulados (média ± DP, n = 9).

Força de compressão (N/cm <sup>2</sup> )				
<b>Dia 0</b>	133 ± 17 <sup>a</sup>	151 ± 34 <sup>a</sup>	282 ± 13 <sup>b</sup>	769 ± 45 <sup>c</sup>
<b>Dia 3</b>	471 ± 77 <sup>a</sup>	405 ± 77 <sup>a</sup>	1143 ± 77 <sup>b</sup>	2256 ± 119 <sup>c</sup>
<b>Dia 7</b>	853 ± 110 <sup>a</sup>	1448 ± 103 <sup>b</sup>	2270 ± 130 <sup>c</sup>	2584 ± 126 <sup>d</sup>
Taxa de envelhecimento (%)				
<b>Dia 0 – Dia 3</b>	72	63	75	66
<b>Dia 3 – Dia 7</b>	45	72	50	13
<b>Dia 0 – Dia 7</b>	84	90	88	70

Dia 0 – dia em que foi elaborado a formulação. Em cada linha letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Cavalcante Neto (2012) relatou que a farinha de MB contém  $12,85\% \pm 1,02$  de fibra solúvel e  $3,09\% \pm 0,08$  de fibra insolúvel, demonstrando ser uma boa fonte de fibras, principalmente solúveis, demonstrando que as fibras também contribuem para uma firmeza maior do pão comparado ao pão 100% farinha de trigo. A textura pode ser definida como os atributos mecânicos, geométricos e de superfície de um produto que são perceptíveis pelo uso de instrumentos e por meios sensoriais. Para produtos panificados mostra-se dependente da formulação, no que tange a qualidade da farinha; quantidade de açúcares, gorduras, emulsificantes, enzimas e mesmo a adição de glúten e melhoradores de farinha; humidade da massa, e conservação (Esteller & Lannes, 2005).

Com os resultados da força de compressão dos pães, foi também registado a evolução da sua vida útil por um período de sete dias. Esses resultados foram observados através do índice de retrogradação, que é explicada pela sinérese, processo no qual ocorre a expulsão da água do interior do amido, interferindo diretamente no volume e aumentando a firmeza do produto (Ribeiro & Seravlli, 2007). Os resultados estão apresentados em percentagem na **Tabela 11** para melhor visualização da taxa de envelhecimento comparando os dias 0 e 3, 3 e 7 e 0 e 7 de armazenamento.

Todas as formulações apresentaram maiores percentagens de envelhecimento nos três primeiros dias que nos dias seguintes, exceto a formulação B12. Observa-se também que a formulação B12 foi a que apresentou maior interferência neste aspecto, pois apresentou-se com a maior taxa de envelhecimento (90%) do dia em que foi elaborado até o sétimo dia de armazenamento. No entanto, a formulação com maior substituição de

MB (B24) apresentou menor porcentagem de envelhecimento (70%) dentre todas as formulações. Sabe-se que a retrogradação do amido é um fenômeno que ocorre após o aquecimento e pode alterar a viscosidade do mesmo, ou seja, esse fenômeno é responsável pelo envelhecimento do pão, que é caracterizado pelo aumento da firmeza do miolo e pela perda do frescor. Uma vez que a retrogradação está associada à quantidade de água no pão durante seu armazenamento, a presença do mesocarpo de babaçu afeta este fenômeno, como demonstrado por Cavalcante Neto (2012) a capacidade de retenção de água da farinha de MB ( $237,36\% \pm 0,34$ ) é superior à da farinha de trigo ( $162,24\% \pm 0,28$ ), interferindo na distribuição da água no sistema, levando em conta que na retrogradação ocorre a reassociação das cadeias de amilose com a liberação de moléculas de água ocorrendo a cristalinização.

A análise dos parâmetros de cor apresentados na **Tabela 12**, nomeadamente  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , são de todo relevantes, dado que estão diretamente associados à potencial aceitação de novos produtos por parte dos consumidores. Os parâmetros de cor dos pães podem estar relacionados com os ingredientes e as suas condições de processamento. Atividades como a reação de Maillard desenvolvem-se durante o processo, alterando a cor dos produtos de acordo com o teor de açúcares, proteínas presentes e a temperatura de cozedura (Shen, et al., 2018).

**Tabela 12** – Parâmetros de cor de miolo dos pães formulados (média  $\pm$  DP, n = 9).

Parâmetros de cor				
$L^*$	$68 \pm 4^a$	$41 \pm 3^b$	$41 \pm 2^b$	$37 \pm 3^b$
$a^*$	$-5,5 \pm 0,3^a$	$0,5 \pm 0,2^b$	$2,0 \pm 0,3^c$	$3,1 \pm 0,2^d$
$b^*$	$16 \pm 1^a$	$13 \pm 1^b$	$16 \pm 1^a$	$16,1 \pm 0,7^a$

Em cada linha letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

A coordenada  $a^*$ , que indica a variação de verde (-60) a vermelho (+60), é um parâmetro importante para o estudo de escurecimento, pois a cor castanha, resultante da degradação dos açúcares ou reações enzimáticas, representa uma combinação do verde e vermelho. Um maior escurecimento é representado por um tom mais avermelhado, ou seja, maior valor de  $a^*$ . A coordenada  $b^*$ , relacionada ao eixo que varia de azul (-60) a amarelo (+60), demonstrou variações entre a formulação B12 e as demais, situando-se na faixa positiva e com maior tendência para o azul, quando comparado às outras formulações. O pão com adição de 24% (B24) de farinha de MB alcançou coloração mais intensa de amarelo-castanho que o pão sem adição de farinha.

A farinha do mesocarpo do babaçu possui uma cor característica, castanho avermelhada ( $L^* 66,72 \pm 0,81$ ;  $a^* 11,89 \pm 0,02$ ;  $b^* 22,88 \pm 0,11$ ), atribuída a presença de grande concentração de compostos fenólicos, os quais apresentam absorção no infravermelho no comprimento de 275 nm e possível fluorescência na região do vermelho (~ 650 nm), tais compostos coloridos são solúveis em água e etanol, e a coloração da farinha do babaçu não se degrada com o tratamento térmico e confere um diferencial nos produtos adicionados (Camili & Copini, 2019).

Conforme houve um aumento na percentagem de farinha de mesocarpo de babaçu nos pães, ocorreu uma diminuição na luminosidade, apresentando os valores de  $L^*$  menor que 60, o qual demonstrou que os pães com percentagem de farinha de mesocarpo do babaçu tendem para uma coloração mais escura e opaca, ou seja, menos brilhantes que a amostra controle ( $68 \pm 4$ ), no entanto entre as formulações com substituições não houve diferença significativa neste parâmetro. Em um estudo realizado por Andrade e colaboradores (2017) relata os parâmetros de cor do miolo para pães integrais ( $L^* 59,94 \pm 0,53$ ;  $a^* 6,32 \pm 0,29$ ;  $b^* 18,82 \pm 0,13$ ), apesar de os valores da luminosidade serem bastante diferentes aos encontrados neste estudo para os pães com MB, o que mais se assemelha à cor do pão integral é a formulação B24. A cor do produto é um fator importante ao alimento, está relacionada a muitos fatores tecnológicos e afetivos, atualmente também relacionada a saudabilidade devido a alimentos ricos em fibra terem cor mais escura em relação à sua versão refinada (Dauda, et al., 2018).

## 5.2.2. Composição nutricional e química

### 5.2.2.1. Composição centesimal, açúcares, ácidos orgânicos e ácidos gordos

No que concerne ao valor nutricional dos pães (**Tabela 13**), confirma-se que o nutriente mais abundante são os hidratos de carbono, seguido da humidade e proteínas. É possível perceber que a adição do MB fez diminuir a quantidade de proteínas comparativamente com o controle, isto se dá ao fato de a farinha de trigo possuir maiores teores de proteínas que a farinha obtida do MB, como demonstrado por Ruiz (2009), a componente proteína na farinha de trigo pode variar em 10 a 12 %, valor superior ao encontrado no MB. O maior valor de proteína encontrado nos pães formulados com farinha de MB foi em relação ao pão com 12 % de farinha de mesocarpo, obtendo valor de  $7,35 \pm 0,02$  g/100 g ps.

**Tabela 13** - Composição proximal, valor energético, açúcares livres e ácidos orgânicos dos pães desenvolvidos (média ± DP, n = 9).

Valor nutricional (g/100 g ps)	B0	B12	B18	B24
Humidade	7,98 ± 0,04 <sup>a</sup>	7,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	7,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	7,88 ± 0,04 <sup>a</sup>
Gordura total	3,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	5,8 ± 0,3 <sup>b</sup>	5 ± 1 <sup>c</sup>	3,8 ± 0,2 <sup>a</sup>
Proteína	7,41 ± 0,01 <sup>a</sup>	7,35 ± 0,02 <sup>b</sup>	6,6 ± 0,1 <sup>c</sup>	6,7 ± 0,1 <sup>d</sup>
Cinzas	2,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,75 ± 0,04 <sup>b</sup>	2,8 ± 0,1 <sup>c</sup>	2,1 ± 0,1 <sup>a</sup>
Hidratos de carbono	87,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	85,1 ± 0,3 <sup>b</sup>	85,6 ± 0,5 <sup>c</sup>	87,5 ± 0,2 <sup>a</sup>
Valor energético (kcal/100 g ps)	408 ± 1 <sup>a</sup>	422 ± 1 <sup>b</sup>	414 ± 4 <sup>c</sup>	410,4 ± 0,3 <sup>a</sup>
<b>Açúcares Livres (g/100 g ps)</b>				
Frutose	2,117 ± 0,003 <sup>a</sup>	1,96 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,84 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,257 ± 0,003 <sup>d</sup>
Glucose	0,25 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>c</sup>
<b>Total de açúcares livres</b>	<b>2,37 ± 0,03<sup>a</sup></b>	<b>2,12 ± 0,03<sup>b</sup></b>	<b>2,00 ± 0,02<sup>c</sup></b>	<b>1,35 ± 0,01<sup>d</sup></b>
<b>Ácidos Orgânicos (g/100 g ps)</b>				
Ácido quínico	0,24 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,16 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>b</sup>
Ácido málico	0,04 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,063 ± 0,002 <sup>b</sup>	0,0904 ± 0,0003 <sup>c</sup>	0,127 ± 0,002 <sup>d</sup>
Ácido cítrico	0,07 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>ab</sup>
<b>Total de ácidos orgânicos</b>	<b>0,35 ± 0,05<sup>a</sup></b>	<b>0,30 ± 0,02<sup>b</sup></b>	<b>0,21 ± 0,04<sup>c</sup></b>	<b>0,35 ± 0,02<sup>a</sup></b>

ps – peso seco; Em cada linha letras diferentes significam diferenças significativas entre espécies ( $p < 0,05$ ).

Melo e Vasconcelos (2011) classificam os alimentos, em relação à humidade, em: alimentos de alta humidade (> 40 %), alimentos de humidade intermédia (20 a 40 %) e alimentos de baixa humidade (< 20 %). Ao avaliarmos a humidade dos pães formulados, observa-se que estes estão entre 7-8% de humidade, concluindo-se então que são alimentos de baixa humidade; alimentos com esta faixa de humidade são de preservação fácil e o número de outros microrganismos que se desenvolvem nesse meio é reduzido e de crescimento lento. Ainda que algumas variações tenham sido ligeiras, o perfil nutricional do pão com 24% de substituição em comparação com o pão controlo composto por 100% de farinha de trigo, não alterou significativamente os teores de humidade, gordura total, cinzas, hidratos de carbono e valor energético. Para as formulações B12 e B18 apenas a humidade entre estas duas formulações não foram significativamente diferentes, já em comparação com as formulações controlo e B24, apresentaram diferenças significativas para todos os componentes da composição centesimal.

Relativamente ao teor em açúcares, verificou-se a presença de glucose e frutose, sendo o último o açúcar maioritário em todas as formulações. Observa-se que o teor de

açúcares decresce quanto maior a quantidade de mesocarpo de babaçu, apresentando uma variação de 40% em relação à frutose e de 64% em relação à glucose entre as formulações B0 e B24. Este facto está possivelmente relacionado às reações de Maillard devido à grandes quantidades de hidratos de carbono presentes na farinha de mesocarpo de babaçu. O maior valor de açúcares livres observado foi no pão controlo ( $2,37 \pm 0,03$  g/100 g ps), valor concordante com o determinado por Perez e Germani (2004), que relatam que o teor de açúcares livres encontrados na farinha de trigo é de aproximadamente 3,0 g/100 g ps. De acordo com a Resolução nº 27/1998 da ANVISA, que trata do Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar, um alimento é considerado com baixo teor de açúcares se conter um máximo de 5 g/100 g de produto. No caso dos pães com farinha de MB, todas apresentaram um baixo teor de açúcares, podendo ser consideradas como tal.

A composição de ácidos orgânicos foi determinada e foi possível identificar a presença de três ácidos orgânicos (ácido quínico, ácido málico e ácido cítrico) em todas as amostras analisadas. Entre os ácidos orgânicos identificados, o ácido quínico foi o maioritário encontrado nas amostras, sendo a formulação controlo (B0) com maior teor  $0,24 \pm 0,03$  mg/100 g ps. Entretanto, o ácido málico na concentração de  $0,04 \pm 0,01$  (B0) mg/100 g ps revelou uma menor representatividade em comparação com os demais. No geral, a formulação controlo (B0) apresentou-se com maior composição em ácidos orgânicos ( $0,35 \pm 0,05$  g/100 g ps), seguida da formulação com 24% de substituição da farinha de trigo pela farinha de MB (B24,  $0,35 \pm 0,02$  g/100 g ps).

Os ácidos gordos individuais, saturados, monoinsaturados e polinsaturados presentes nas amostras encontram-se discriminados na **Tabela 14**. No total foram identificados 20 ácidos gordos individuais nas amostras, tendo-se destacado como maioritários os ácidos palmíticos (C16:0), oleico (C18:1n9c), esteárico (C18:0) margárico (C17:0) e linoleico (C18:2n6c). Pode-se observar um número maior de ácidos gordos quando comparado com a matriz da farinha de MB (**Secção 5.1.1**), isso pode ser explicado devido a formulação dos pães que leva acréscido de óleo, o que proporciona uma maior quantidade e identificação de ácidos gordos.

**Tabela 14** - Composição em ácidos gordos (%) dos pães desenvolvidos (média ± DP, n = 9).

Ácidos gordos (%)	B0	B12	B18	B24
Ácido capróico (C6:0)	1,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,821 ± 0,004 <sup>c</sup>	0,676 ± 0,002 <sup>d</sup>
Ácido caprílico (C8:0)	1,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,92 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,59 ± 0,01 <sup>b</sup>
Ácido cáprico (C10:0)	0,55 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>d</sup>
Ácido láurico (C12:0)	0,67 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,87 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,52 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,272 ± 0,002 <sup>d</sup>
Ácido tridecanóico (C13:0)	0,37 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,170 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,248 ± 0,004 <sup>c</sup>	0,167 ± 0,003 <sup>b</sup>
Ácido mirístico (C14:0)	1,09 ± 0,03 <sup>a</sup>	3,11 ± 0,02 <sup>b</sup>	3,18 ± 0,03 <sup>c</sup>	1,38 ± 0,01 <sup>d</sup>
Ácido miristoleico (C14:1)	nd	0,250 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,264 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>c</sup>
Ácido pentadecílico (C15:0)	nd	0,351 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,4144 ± 0,0002 <sup>b</sup>	0,229 ± 0,004 <sup>c</sup>
Ácido palmítico (C16:0)	33,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	31,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	32,6 ± 0,1 <sup>c</sup>	22,1 ± 0,1 <sup>d</sup>
Ácido palmitoleico (C16:1)	nd	1,60 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,496 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,365 ± 0,002 <sup>c</sup>
Ácido margárico (C17:0)	12 ± 1 <sup>a</sup>	5,9 ± 0,2 <sup>b</sup>	7,1 ± 0,1 <sup>c</sup>	5,3 ± 0,1 <sup>d</sup>
Ácido esteárico (C18:0)	12,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	9,94 ± 0,03 <sup>b</sup>	13,4 ± 0,1 <sup>c</sup>	9,35 ± 0,02 <sup>d</sup>
Ácido oleico (C18:1n9c)	28 ± 1 <sup>a</sup>	31,1 ± 0,3 <sup>b</sup>	27,3 ± 0,2 <sup>c</sup>	29,9 ± 0,1 <sup>d</sup>
Ácido linoleico (C18:2n6c)	nd	8,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,17 ± 0,01 <sup>b</sup>	24,4 ± 0,1 <sup>c</sup>
Ácido alfa-linolênico (C18:3n3)	nd	0,51 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,39 ± 0,01 <sup>c</sup>
Ácido eicosanóico (C20:0)	1,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,85 ± 0,02 <sup>c</sup>	1,147 ± 0,004 <sup>d</sup>
Ácido cis-11-Eicosenóico (C20:1)	2,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,26 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,186 ± 0,002 <sup>d</sup>
Ácido cis-11,14-eicosadienóico (C20:2)	1,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,45 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,68 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,98 ± 0,01 <sup>c</sup>
Ácido araquidônico (C20:4n6)	nd	0,475 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,049 ± 0,002 <sup>c</sup>
Ácido behênico (C22:0)	2,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,21 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,13 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,32 ± 0,01 <sup>c</sup>
<b>SFA</b>	<b>68 ± 1<sup>a</sup></b>	<b>55,04 ± 0,32<sup>b</sup></b>	<b>63,5 ± 0,2<sup>c</sup></b>	<b>42,7 ± 0,2<sup>d</sup></b>
<b>MUFA</b>	<b>31 ± 1<sup>a</sup></b>	<b>33,9 ± 0,3<sup>b</sup></b>	<b>30,3 ± 0,2<sup>a</sup></b>	<b>31,5 ± 0,1<sup>c</sup></b>
<b>PUFA</b>	<b>1,2 ± 0,1<sup>a</sup></b>	<b>11,1 ± 0,1<sup>b</sup></b>	<b>6,280 ± 0,001<sup>c</sup></b>	<b>25,8 ± 0,1<sup>d</sup></b>

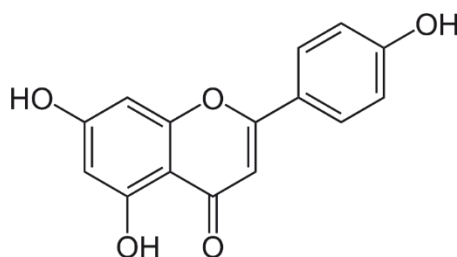
ps – peso seco; nd – não detetado; SFA – *saturated fatty acids* (ácidos gordos saturados); MUFA – *monounsaturated fatty acids* (ácidos gordos monoinsaturados); PUFA – *polyunsaturated fatty acids* (ácidos gordos polinsaturados). Em cada linha letras diferentes significam diferenças significativas entre espécies ( $p < 0,05$ ).

Algumas divergências foram observadas na composição de ácidos gordos nas formulações analisadas, pois os ácidos gordos saturados apresentaram-se maioritariamente na formulação controlo (B0) representando cerca de 68% dos AG; a formulação B0 também apresentou a menor quantidade em ácidos gordos polinsaturados com apenas 1,2 %, enquanto os mesmos se destacaram na formulação com 24% de substituição da farinha de trigo por MB, com aproximadamente 26% da composição em PUFA. A composição em ácidos monoinsaturados não apresentou grande variação em relação as amostras, no entanto a formulação B12 foi também a que apresentou maior quantidade (aprox. 34%).

Em suma, pode-se observar um resultado positivo frente as adições do mesocarpo de babaçu, visto que a quantidade de SFAs diminui conforme a adição, aumentando o teor de PUFAs. De referir ainda que no grupo dos PUFA predominam os ácidos gordos  $\omega$ -3, sendo o composto maioritário o ácido  $\alpha$ -linolénico. No que respeita a dieta humana, é de elevada importância o consumo de quantidades adequadas de ácidos gordos  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6, em virtude de alguns destes compostos desempenharem funções fisiológicas relevantes, tais como a prevenção de doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias crónicas, ação anti-inflamatória e antitrombótica, ação sobre o crescimento fetal e desenvolvimento neural e participação em funções imunoduladoras (Perini, et al., 2010).

#### 5.2.2.2. Composição em compostos fenólicos

Os dados relativos à composição fenólica do extrato hidroetanólico dos pães desenvolvidos estão descritos na **Tabela 15**. Assim como foi descrito na **secção 5.1.2.**, a sequência de numeração de picos segue o tempo de retenção de todos os compostos identificados. Todos os picos encontrados nas amostras de pão, foram identificados no extrato da farinha de babaçu, à exceção do pico 9 (**Figura 16**), tentativamente identificado como apigenina-*C*-sinapoilpentosil-*C*-hexósido pelo descrito anteriormente por Liu et al. (2010) em amostras de trigo. Como seria expectável, a amostra B0 (trigo a 100%) não revelou um perfil fenólico semelhante à dos restantes pães, tendo sido descrita a presença de flavan-3-óis e outros flavonoides glicosilados, como a Quercetina-3-*O*-glucósido, em trigo sarraceno (Aleksenko, 2013).



**Figura 16** - Estrutura química da apigenina (Dolcevitaaonline, 2016).

Relativamente à concentração de compostos fenólicos nos pães, todas as formulações desenvolvidas com farinha de babaçu revelaram menos valores do que as encontradas para a farinha (**Tabela 7**). A hipótese para tal resultado é devido ao processamento do produto (cozedura sobretudo) que pode ter levado à degradação de alguns compostos. A amostra B24 apresentou os maiores teores de compostos fenólicos

totais ( $2,198 \pm 0,061$  mg/g extrato) e de flavan-3-óis ( $1,815 \pm 0,06$  mg/g extrato), sendo que, apesar de em quantidades vestigiais, foram também encontrados alguns ácidos fenólicos.

**Tabela 15** - Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do ultravioleta ( $\lambda_{\text{máx}}$ ), dados de espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação (mg/g extrato) dos compostos fenólicos presentes em extratos hidroanólicos dos pães desenvolvidos (média  $\pm$  DP).

Pico	Tr (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ [M-H] <sup>+</sup>		Identificação Tentativa	Quantificação (mg/g extrato)			
		(nm)	(m/z)		B0	B12	B18	B24
2	5,76	280	289	(+)-Catequina	nd	$0,3176 \pm 0,0001^c$	$0,52 \pm 0,01^b$	$0,9 \pm 0,1^a$
4	7,83	280	289	(-)-Epicatequina	nd	$0,20 \pm 0,02^c$	$0,26 \pm 0,01^b$	$0,423 \pm 0,003^a$
5	9,12	283	1153	Tetramero de (Epi)catequina tipo $\beta$	nd	$0,185 \pm 0,01^c$	$0,276 \pm 0,004^b$	$0,29 \pm 0,01^a$
7	10,49	283	1153	Tetramero de (Epi)catequina tipo $\beta$	$0,19 \pm 0,01^b$	$0,15 \pm 0,01^d$	$0,179 \pm 0,004^c$	$0,24 \pm 0,01^a$
8	12,44	283	1441	Pentamero de (Epi)catequina tipo $\beta$	$0,024 \pm 0,001$	nd	nd	nd
10	17,07	334	463	Quercetina-3-O-glucósido	$0,396 \pm 0,001^b$	$0,422 \pm 0,001^a$	$0,388 \pm 0,001^c$	$0,3823 \pm 0,0004^d$
11	19,48	344	769	Apigenina-C-sinapoilpentosil-C-hexósido	vg	nd	nd	nd
				<b>Compostos fenólicos totais</b>	<b><math>0,62 \pm 0,01^d</math></b>	<b><math>1,28 \pm 0,03^c</math></b>	<b><math>1,6164 \pm 0,0002^b</math></b>	<b><math>2,2 \pm 0,1^a</math></b>
				<b>Ácidos fenólicos totais</b>	<b>nd</b>	<b>nd</b>	<b>nd</b>	<b>vg</b>
				<b>Flavan-3-óis totais</b>	<b><math>0,22 \pm 0,01^d</math></b>	<b><math>0,86 \pm 0,03^c</math></b>	<b><math>1,229 \pm 0,001^b</math></b>	<b><math>1,8 \pm 0,1^a</math></b>
				<b>Flavonóis</b>	<b><math>0,396 \pm 0,001^c</math></b>	<b><math>0,422 \pm 0,001^{ab}</math></b>	<b><math>0,388 \pm 0,001^d</math></b>	<b><math>0,43 \pm 0,02^a</math></b>

nd – não detetado. vg – quantidades vestigiais. MS<sup>2</sup> (m/z): pico 2 - 325(20), 289 (100), 245(100), 205(41); pico 4 - 325(20), 289 (100), 245(100), 205(41); pico 5 - 865(68), 713(20), 695(2), 577(22), 575(40), 425(5), 407(5), 289(5), 287(10); pico 7 - 865(68), 713(20), 695(2), 577(22), 575(40), 425(5), 407(5), 289(5), 287(10); pico 8 - 1153(12), 865(68), 713(20), 695(2), 577(22), 575(40), 425(5), 407(5), 289(5), 287(10); pico 10 - 301(100); e pico 11 - 675(29), 545(100), 519(41), 425(52), 335(10).

### 5.2.3. Propriedades Bioativas

#### 5.2.3.1. Atividade antioxidante e citotoxicidade

A atividade antioxidante das diferentes formulações foi avaliada através dos métodos de inibição da peroxidação lipídica em tecidos cerebrais de porco através da formação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e inibição da hemólise oxidativa em eritrócitos isolados do sangue de ovelha (OxHLIA). Os resultados foram expressos em termos de EC<sub>50</sub> (valor que representa a concentração de uma amostra que fornece 50% de atividade antioxidante) e estão apresentados na **Tabela 16**.

Todos os extratos analisados apresentaram excelente atividade antioxidante para o ensaio do TBARS, todas com IC<sub>50</sub> abaixo do controlo positivo (Trolox: 3,7 ± 0,5 µg/mL). No entanto, considerando que quanto menor o valor de EC<sub>50</sub> maior a sua capacidade antioxidante, é possível verificar que as formulações com 18 e 24% apresentaram maior atividade antioxidante (0,67 ± 0,02 µg/mL e 0,64 ± 0,01 µg/mL, respetivamente) relativamente à formulação B12, com 12% de substituição. Esses resultados indicam que a adição da farinha de MB em produtos de panificação, como é o caso do pão, é válida, mantendo a característica antioxidante encontrada no presente estudo do extrato hidroetanólico do mesocarpo de babaçu.

**Tabela 16** - Atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos dos pães desenvolvidos (média ± DP, n = 9).

Atividade antioxidante (IC <sub>50</sub> , µg/mL)	B0	B12	B18	B24	Trolox
TBARS	sa	1,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,64 ± 0,01 <sup>b</sup>	3,7 ± 0,5 <sup>c</sup>
OxHLIA	sa	2813 ± 148 <sup>a</sup>	946 ± 23 <sup>b</sup>	618 ± 23 <sup>c</sup>	21,8 ± 0,2 <sup>d</sup>

sa – sem atividade. Os valores de IC<sub>50</sub> correspondem à concentração do extrato que atinge 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância na redução do ensaio de potência. Em cada linha letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

No ensaio de OxHLIA, as amostras apresentaram alguma atividade antioxidante com um IC<sub>50</sub> entre 2813 ± 148 e 618 ± 23 µg/mL. No entanto, comparativamente com o controlo positivo (Trolox; 21,8 µg/mL) as formulações apresentaram baixa capacidade anti-hemolítica.

Vale ressaltar que não foi identificado atividade antioxidante para a formulação controlo, embora existam trabalhos descritos na literatura que relatam que esta possui atividade antioxidante realizados em outros tipos de ensaios, como por exemplo através do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e por meio da redução de ferro (FRAP). Em alguns países é habitual enriquecer as farinhas brancas com vitaminas e minerais para compensar as perdas sofridas, quando se elimina o farelo e o germe. Contudo, as farinhas brancas não incorporam a fibra nem as substâncias antioxidantes, presentes precisamente nesses dois componente, farelo e germe (Pallarés, et al., 2007)

Os estudos de literatura sobre a atividade citotóxica de produtos com substituição parcial da farinha de tripo pela farinha de mesocarpo de babaçu são escassos. Os resultados obtidos no ensaio de hepatotoxicidade não estão presentes em tabela, pois todos os extratos hidroetanólicos das formulações dos pães não apresentaram atividade

até à concentração máxima testada (400 µg/mL). Significando isto, que os pães elaborados nas concentrações de 12, 18 e 24%, bem como a formulação controlo, não foram tóxicas contra as linhas celulares não tumoral estudadas (VERO e PLP2), sendo um resultado muito importante numa primeira validação desta farinha na incorporação dessa matriz alimentar sem que tal acarrete riscos para a saúde do consumidor.

### 5.2.3.2. Atividade antimicrobiana

As opções de agentes antimicrobianos eficientes são cada vez mais escassas devido ao facto de as estirpes bacterianas terem capacidade de desenvolver mutações genéticas que, ao serem transmitidas às gerações seguintes, levam a que os antibióticos deixem de ser eficientes. A Organização Mundial de Saúde considera esta temática uma das mais preocupantes na área da saúde, incitando à procura de agentes antibacterianos ainda não existentes no mercado (Enioutina, et al., 2017). Tendo em conta o potencial associado aos recursos naturais e ao facto de se tratar de uma área ainda pouco explorada atendendo à enorme quantidade e variedade de espécies vegetais presentes no nosso planeta, estes recursos têm vindo a ser cada vez mais alvo de atenção, podendo ser uma fonte de novas soluções para este grave problema de saúde pública (Tacconelli, et al., 2018).

A **Tabela 17** apresenta os resultados das atividades antibacteriana e antifúngica obtidos para o extrato em Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) e estão expressos em mg/mL. A atividade antimicrobiana associada a amostra é maior quanto menor for o valor da concentração mínima inibitória (CMI), ou seja, é a mais baixa concentração de um produto responsável por limitar o crescimento visível de uma bactéria. De salientar que neste trabalho foram utilizados microrganismos obtidos de isolados clínicos, que frequentemente apresentam maior resistência a antibióticos em comparação com estirpes comerciais.

De um modo geral, constata-se que, para as concentrações testadas, *E. coli* foi a bactéria que surgiu como a mais sensível para todos os extratos analisados. Em relação ao *B. cereus* os pães com substituições (B12, B18 e B24) apresentaram os mesmos valores, tanto para CMI quanto para CMB, condizente com a análise prévia do MB, visto que apresentou grande potencial contra este microrganismo, o que significa um bom resultado pois o *B. cereus* é uma bactéria formadora de esporos que ocorre naturalmente em muitos tipos de alimentos podendo ocasionar doenças em humanos, estes esporos

podem resistentes ao aquecimento e à desidratação e pode, portanto, sobreviver à cozedura e ao armazenamento seco, podendo então germinar e produzir toxinas: enterotoxinas (toxina diarreia) pela ingestão de alimentos contaminados, o crescimento bacteriano local e a subsequente produção de toxinas nos intestinos do hospedeiro; e a toxina emética (cereulide) pela ingestão de alimentos que contenham toxina pré-formada (Rajkovic, 2014).

**Tabela 17** - Atividade antibacteriana e antifúngica (CMI e CMB em mg/mL) das amostras dos pães desenvolvidas.

Atividade antibacteriana												
	B0		B12		B18		B24		E211		E224	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>S. aureus</i>	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	4	4	1	1
<i>B. cereus</i>	>8	>8	4	8	4	8	4	8	0.5	0.5	2	4
<i>L. monocytogenes</i>	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	1	2	0.5	1
<i>E. coli</i>	2	4	2	4	2	4	2	4	1	2	0.5	1
<i>S. typhimurium</i>	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	1	2	1	1
<i>En. cloacae</i>	4	8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	2	4	0.5	0.5
Atividade antifúngica												
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>A. fumigatus</i>	1	2	1	2	8	>8	>8	>8	4	4	1	1
<i>A. niger</i>	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	0.5	0.5	2	4
<i>A. versicolor</i>	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	1	2	0.5	1
<i>P. funiculosum</i>	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	1	2	0.5	1
<i>P. v. cyclospium</i>	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	1	2	1	1
<i>T. viride</i>	>8	>8	>8	>8	>8	>8	1	2	2	4	0.5	0.5

*B. cereus*: *Bacillus cereus*; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; *L. monocytogenes*: *Listeria monocytogenes*; *E. coli*: *Escherichia coli*; *En. Cloacae*: *Enterobacter cloacae*; *S. typhimurium*: *Salmonella typhimurium*. *A. fumigatus*: *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*: *Aspergillus niger*, *A. versicolor*: *Aspergillus versicolor*, *P. funiculosum*: *Penicillium funiculoiculo*, *P. v. cyclospium*: *Penicillium verrucosum cyclospium* e *T. viride*: *Trichoderma viride*. CMI: Concentração mínima inibitória; CMB: Concentração mínima bactericida. Controlos positivos: E211 (benzoato de sódio) e E224 (metabissulfito de potássio).

Na literatura encontram-se estudos que relatam o desenvolvimento de produtos com substituições da farinha de trigo pela farinha de mesocarpo de babaçu. Cavalcante Neto (2016) utilizou a farinha de MB no preparo de massa alimentícia fresca tipo talharim, com substituições de 10, 15 e 20%, nestas mesmas concentrações Santana e colaboradores (2007) elaboraram biscoitos enriquecidos com a farinha de MB. Pires (2016) aplicou na produção de bolos com 50, 60, 80 e 100% de substituição da farinha de trigo por farinha de MB. Existem também aplicações do MB em produtos sem glúten

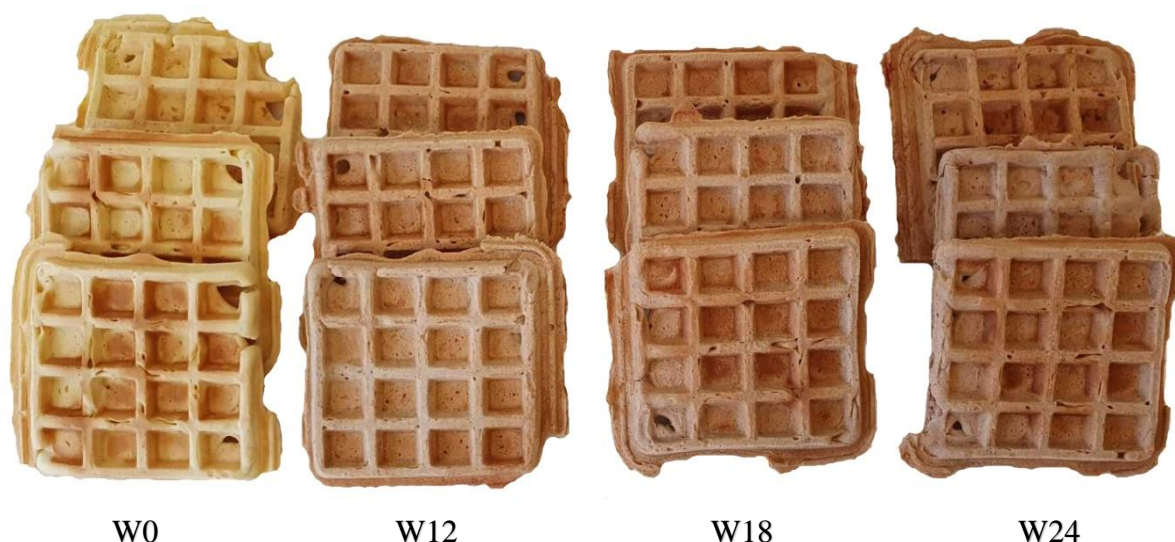
como apresentados por Oliveira e colaboradores (2020) na elaboração de massa alimentícia com diferentes concentrações de farinha de babaçu, arroz e pupunha. No entanto, não foi possível encontrar estudos sobre a análise da atividade antimicrobiana relacionados a produtos alimentares com substituições/misturas de farinhas, por isso ressalva-se a importância de se realizar estudos mais profundos sobre a aplicação desta PANC em produtos alimentares.

Através da análise dos resultados apresentados para a atividade antifúngica (**Tabela 17**) verificou-se que os fungos *A. fumigatus* e *T. viride* foram os únicos que apresentaram CMI e CMB. Para *A. fumigatus* os extratos dos pães B0 e B12 apresentaram bom potencial inibitório (1 mg/mL) e bactericida (2 mg/mL), já o extrato B18 apresentou apenas CMI de 8 mg/mL o dobro do valor quando com o controlo positivo E211 utilizado. Para *T. viride* o único extrato que apresentou potencial inibitório e bactericida foi o do pão B24 com 1 mg/mL e 2 mg/mL, respectivamente. Estes resultados são de extrema importância, pois as estirpes fúngicas em causa são as principais causadoras de deterioração microbiana em produtos de panificação, sendo causadoras de doenças em humanos podendo causar reações de hipersensibilidade até formas pulmonares e cerebrais (Nionelli, et al., 2020). Os estudos de literatura sobre a atividade antifúngica de produtos com substituição parcial da farinha de trigo pela farinha de mesocarpo de babaçu são escassos.

### **5.3. Caracterização dos produtos de pastelaria (waffles)**

#### **5.3.1. Parâmetros físicos**

Na **Figura 17** estão apresentadas as fotos dos waffles produzidos com 100% de farinha de trigo (W0 - controlo) e as substituições de 12% (W12), 18% (W18) e 24% (W24) da farinha trigo pela farinha de mesocarpo de babaçu, os resultados das análises de peso (g), volume (ml) e volume específico (ml/g) dos mesmos estão apresentados na **Tabela 18**.



**Figura 17** - Waffles e suas respectivas substituições da farinha de trigo pela farinha de mesocarpo de babaçu (Autoria própria, 2021).

Os valores encontrados mostram que a aplicação da farinha de PANC influenciam diretamente no volume específico (VE) dos waffles, entretanto os valores de peso e volume não demonstraram tanta variação. O VE do waffle controle (100% farinha de trigo) foi de  $1,92 \pm 0,03$  mL/g; neste parâmetro foi possível observar um decréscimo com a maior concentração de farinha incorporada. O waffle com a maior substituição de 24% (W24) obteve um volume de  $1,63 \pm 0,02$  mL/g, ou seja, houve um decréscimo de aproximadamente 15% em relação ao waffle controle (W0). Em um estudo realizado por Chaitra e colaboradores (2020), fez-se substituição parcial da farinha de trigo por farinha de milho em waffles belgas, o waffle controle apresentou VE de 2,81 mL/g e os waffles com substituição pela farinha de milho apresentaram uma média de VE de 2,03 mL/g, havendo um decréscimo de 28% aproximadamente.

**Tabela 18** – Parâmetros físicos dos waffles desenvolvidos (média  $\pm$  DP, n = 9).

Parâmetros físicos	W0	W12	W18	W24
Peso (g)	$39 \pm 2^a$	$42 \pm 2^b$	$39 \pm 2^a$	$40 \pm 2^{ab}$
Volume (ml)	$75 \pm 3^a$	$73 \pm 5^a$	$62 \pm 3^b$	$65 \pm 5^b$
Volume específico (ml/g)	$1,92 \pm 0,03^a$	$1,73 \pm 0,02^b$	$1,59 \pm 0,02^c$	$1,63 \pm 0,02^d$

Em cada linha letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Relativamente aos resultados da análise de textura (**Tabela 19**), verifica-se que o dia em que foram elaborados (Dia 0), as formulações W0 e W12 não apresentaram

diferença significativa e observou-se um aumento de 26 e 20% em comparação com as formulações W18 e W24, respectivamente, este aumento da firmeza ocorre devido ao enfraquecimento do glúten, proveniente da farinha de trigo. Este enfraquecimento ocorre da mesma maneira como foi explicado para os pães, no sub-título **5.2.1**, como a farinha de MB apresenta um alto teor de fibras, as mesmas afetam de forma negativa o aprisionamento dos gases que auxiliam no volume do waffle, fazendo com que cresça menos ficando mais compacto, conseqüentemente aumentando a sua textura. Para além disso, os waffles são produtos que se apresentam sensorialmente mais consistentes, densos e crocantes.

**Tabela 19** – Força de compressão, taxa de envelhecimento dos waffles desenvolvidos (média ± DP, n = 9).

Força de compressão (N/cm <sup>2</sup> )				
<b>Dia 0</b>	1131 ± 33 <sup>a</sup>	1126 ± 62 <sup>a</sup>	1519 ± 129 <sup>b</sup>	1409 ± 101 <sup>b</sup>
<b>Dia 3</b>	1362 ± 52 <sup>a</sup>	1561 ± 154 <sup>bc</sup>	1612 ± 142 <sup>c</sup>	1417 ± 83 <sup>ab</sup>
<b>Dia 7</b>	1429 ± 237 <sup>a</sup>	1845 ± 185 <sup>b</sup>	2039 ± 283 <sup>c</sup>	2256 ± 151 <sup>c</sup>
Taxa de envelhecimento (%)				
<b>Dia 0 – Dia 3</b>	17	28	6	1
<b>Dia 3 – Dia 7</b>	5	15	21	37
<b>Dia 0 – Dia 7</b>	21	39	26	37

Dia 0 – dia em que foi elaborado a formulação. Em cada linha letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Com os resultados da força de compressão dos waffles também foi registado a evolução de sua vida útil em um período de sete dias. Esses resultados foram observados através do índice de retrogradação. Os resultados estão apresentados em percentagem (**Tabela 19**) para melhor visualização da taxa de envelhecimento comparando os dias 0 e 3, 3 e 7, assim como 0 e 7 de armazenamento.

As formulações W0 e W12 apresentaram maiores percentagens de envelhecimento nos três primeiros dias que nos dias seguintes, já as formulações W18 e W24 apresentaram maior percentagem de envelhecimento nos dias 3 a 7. Observa-se também que a formulação W12 foi a que apresentou maior interferência neste aspecto, pois apresentou-se com a maior taxa de envelhecimento (39%) do dia em que foi elaborado até o sétimo dia de armazenamento. A formulação controlo apresentou menor percentagem de envelhecimento (21%) dentre todas as formulações. Sabe-se que a retrogradação do amido é um fenómeno que ocorre após o aquecimento e pode alterar a

viscosidade do mesmo, ou seja, esse fenômeno é responsável pelo envelhecimento do waffle.

A análise dos parâmetros de cor apresentados na **Tabela 20**, nomeadamente  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , são de todo relevantes, dado que estão diretamente associados à potencial aceitação de novos produtos por parte dos consumidores. Os parâmetros de cor dos waffles podem estar relacionados com os ingredientes e as suas condições de processamento. Atividades como a reação de Maillard desenvolvem-se durante o processo, alterando a cor dos produtos de acordo com o teor de açúcares, proteínas presentes e a temperatura de cozedura (Shen, et al., 2018). Esse fenômeno de Maillard pode ser observado nos waffles visto que apresenta grande quantidade de açúcares (cerca de 20% de sua formulação).

**Tabela 20** - Parâmetros de cor dos waffles desenvolvidos (média  $\pm$  DP, n = 9).

Parâmetros de cor				
$L^*$	35 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	40 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	36 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	27 $\pm$ 2 <sup>c</sup>
$a^*$	7 $\pm$ 1 <sup>ac</sup>	7 $\pm$ 1 <sup>ab</sup>	6 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	7,9 $\pm$ 0,3 <sup>c</sup>
$b^*$	32 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	32,2 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	28 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	25 $\pm$ 1 <sup>c</sup>

Em cada linha letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

A coordenada  $a^*$ , que indica a variação de verde (-60) a vermelho (+60), é um parâmetro importante para o estudo de escurecimento, pois a cor castanha, resultante da degradação dos açúcares ou reações enzimáticas, representa uma combinação do verde e vermelho. Um maior escurecimento é representado por um tom mais avermelhado, ou seja, maior valor de  $a^*$ . Pode-se observar que todas as formulações apresentaram valores positivos para  $a^*$  com poucas diferenças significativas, no entanto a formulação se diferenciou significativamente foi a W24, com maior quantidade de farinha de MB. A coordenada  $b^*$ , relacionada ao eixo que varia de azul (-60) a amarelo (+60), não demonstrou variações entre a formulação W0 e W12, já a formulação W18 e W24 apresentaram diferença, no entanto todas encontram-se no eixo positivo tendendo ao amarelo. O waffle com adição de 24% (W24) de farinha de MB alcançou coloração mais intensa de amarelo-castanho que o pão sem adição de farinha de MB.

Como citado, a farinha do mesocarpo do babaçu possui uma cor característica, castanho avermelhada ( $L^*$  66,72  $\pm$  0,81;  $a^*$  11,89  $\pm$  0,02;  $b^*$  22,88  $\pm$  0,11), e sua coloração não se degrada com o tratamento térmico e confere um diferencial nos produtos adicionados (Camili & Copini, 2019). Os resultados do waffle com 24% de MB aproximam-se muito à coloração original do MB. Visualmente percebe-se que com o

aumento na percentagem de farinha de mesocarpo de babaçu nos waffles, ocorre uma diminuição na luminosidade, apresentando os valores de  $L^*$  menor que 60, o qual demonstrou que os waffles tendem para uma coloração mais escura e opaca. A amostra controlo também apresentou valor menor que 60, isto ocorre devido à formação de pigmentação escura proveniente da reação de Maillard.

### 5.3.2. Composição nutricional e química

#### 5.3.2.1. Composição centesimal, açúcares, ácidos orgânicos e ácidos gordos

Os resultados da composição em macronutrientes, açúcares livres e ácidos orgânicos encontram-se representados na **Tabela 21**, para cada formulação de waffles. Até ao presente momento existem poucos estudos na literatura que reportam o perfil nutricional de waffles. No entanto, os hidratos de carbono destacam-se como o componente principal em todas as formulações, de modo que seu menor percentual registado foi para a formulação controlo ( $68,9 \pm 0,1$  g/100 g ps) e o maior para a formulação W24 com  $72,9 \pm 0,2$  g/100 g ps, o que era expectável visto que o MB apresenta grande quantidade em hidratos de carbono como já apresentado anteriormente no sub-título **5.1.1** O teor de proteínas demonstrou-se decrescente frente as adições do mesocarpo de babaçu, isto se dá ao fato de a farinha de trigo possuir maiores teores de proteínas que a farinha obtida do MB, como demonstrado por Ruiz (2009), a componente proteína na farinha de trigo pode variar em 10 a 12 %, valor superior ao encontrado no MB.

A formulação controlo mostrou-se com um maior valor energético ( $534,4 \pm 0,2$  kcal/100 g ps) em comparação com as demais formulações. A maior quantidade de hidratos de carbono e menor quantidade de proteínas deu-se na formulação W24 que se reflete no menor valor calórico ( $518 \pm 1$  kcal/100 g ps). Reduzir o valor energético dos produtos alimentares é um dos objetivos adicionais da indústria alimentar atual. Neste estudo, isso foi possível substituindo farinha de trigo pela farinha de mesocarpo de babaçu. O total de cinzas, que é um índice de teor de minerais no waffle, foi de 0,39 g/100 g ps na formulação W0; observou-se um pequeno aumento nos waffles com 18 e 24% de substituição. Em um estudo realizado por Chaitra e colaboradores (2020), relatou um teor de cinzas de 0,65% para a formulação de waffles controlo, valor superior ao encontrado neste estudo, no entanto, esse resultado superior pode-se dar ao fato dos diferentes

ingredientes utilizados na preparação dos mesmos. Relativamente ao teor em açúcares, verificou-se apenas a presença de sacarose, que é expectável, visto que cerca de 20% da formulação dos waffles é precisamente pela adição de de sacarose na sua preparação.

**Tabela 21** - Composição proximal, valor energético, açúcares livres e ácidos orgânicos dos waffles desenvolvidos (média  $\pm$  DP, n = 9).

Valor nutricional (g/100 g ps)	W0	W12	W18	W24
Humidade	10,9 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	12 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	10 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	11 $\pm$ 1 <sup>a</sup>
Gordura total	27,20 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	27,2 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	26 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	24,03 $\pm$ 0,14 <sup>c</sup>
Proteína	3,5 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	3,08 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	3,2 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	2,7 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>
Cinzas	0,392 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	0,81 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,5 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	0,43 $\pm$ 0,02 <sup>d</sup>
Hidratos de carbono	68,9 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	68,9 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	70 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	72,9 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>
Valor energético (kcal/100 g ps)	534,4 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	533 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	529 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	518 $\pm$ 1 <sup>c</sup>
<b>Açúcares Livres (g/100 g ps)</b>				
Sacarose	20,3 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	21 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	22,2 $\pm$ 0,5 <sup>c</sup>	21,7 $\pm$ 0,1 <sup>bc</sup>
<b>Ácidos Orgânicos (g/100 g ps)</b>				
Ácido oxálico	0,09 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,061 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>	0,0753 $\pm$ 0,0001 <sup>c</sup>	0,093 $\pm$ 0,001 <sup>d</sup>
Ácido málico	0,060 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,051 $\pm$ 0,003 <sup>b</sup>	0,0737 $\pm$ 0,0003 <sup>c</sup>	0,07 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>
Ácido cítrico	0,034 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,069 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>	0,087 $\pm$ 0,002 <sup>c</sup>	0,09 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>
<b>Total de ácidos orgânicos</b>	<b>0,183 <math>\pm</math> 0,01<sup>a</sup></b>	<b>0,18 <math>\pm</math> 0,01<sup>a</sup></b>	<b>0,236 <math>\pm</math> 0,002<sup>b</sup></b>	<b>0,25 <math>\pm</math> 0,01<sup>c</sup></b>

ps – peso seco; Em cada linha letras diferentes significam diferenças significativas entre espécies ( $p < 0,05$ ).

Por sua vez, na composição de ácidos orgânicos foi possível identificar a presença de três ácidos orgânicos (ácido oxálico, ácido málico e ácido cítrico) em todas as amostras analisadas. Entre os ácidos orgânicos identificados, o ácido oxálico foi o maioritário nas amostras W0 e W24 (0,09  $\pm$  0,01 g/100 g ps e 0,093  $\pm$  0,001 g/100 g ps, respectivamente). Entretanto, os ácidos málico e cítrico tiveram maior proporção para amostras W18 e W24. No geral, a formulação com 24% de substituição da farinha de trigo pela farinha de MB foi a que apresentou maior composição em ácidos orgânicos com 0,25  $\pm$  0,01 g/100 g ps.

Os ácidos gordos individuais, saturados, monoinsaturados e polinsaturados presentes nas amostras encontram-se discriminados na **Tabela 22**. Foram identificados 11 ácidos gordos individuais nas amostras, tendo se destacado como maioritários os ácidos palmíticos (C16:0), oleico (C18:1n9c), linoleico (C18:3n6) e esteárico (C18:0). No entanto, algumas divergências foram observadas na composição de ácidos gordos nas formulações analisadas, assim como nos pães, pois os ácidos gordos saturados apresentaram-se maioritariamente na formulação controlo (W0) representando cerca de

53% dos AG; a formulação W0 também apresentou a menor quantidade em ácidos gordos polinsaturados com 9%, enquanto os mesmos se destacaram na formulação com 24% de substituição da farinha de trigo por MB, com aproximadamente 19% da composição em PUFA. A composição em ácidos monoinsaturados não apresentou grande variação em relação as amostras, no entanto a formulação W0 apresentou-se com maior quantidade (aprox. 38%).

**Tabela 22** - Composição em ácidos gordos (%) dos waffles desenvolvidos (média±DP, n= 9).

Ácidos gordos	W0	W12	W18	W24
Ácido mirístico (C14:0)	0,947 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,661 ± 0,002 <sup>b</sup>	0,60 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,57 ± 0,01 <sup>d</sup>
Ácido palmítico (C16:0)	44,17 ± 0,03 <sup>a</sup>	37,136 ± 0,004 <sup>b</sup>	38,9 ± 0,3 <sup>c</sup>	38,51 ± 0,03 <sup>d</sup>
Ácido palmitoleico (C16:1)	0,69 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,396 ± 0,002 <sup>b</sup>	0,441 ± 0,004 <sup>c</sup>	0,503 ± 0,001 <sup>d</sup>
Ácido margárico (C17:0)	0,351 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,096 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,095 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,0945 ± 0,0003 <sup>b</sup>
Ácido esteárico (C18:0)	6,69 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,48 ± 0,02 <sup>b</sup>	5,44 ± 0,1 <sup>b</sup>	5,3 ± 0,1 <sup>c</sup>
Ácido oleico (C18:1n9c)	37,15 ± 0,03 <sup>a</sup>	34,42 ± 0,02 <sup>b</sup>	34,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	35,6 ± 0,1 <sup>c</sup>
Ácido linoleico (C18:2n6c)	9,05 ± 0,01 <sup>a</sup>	20,92 ± 0,01 <sup>b</sup>	19,9 ± 0,2 <sup>c</sup>	18,49 ± 0,01 <sup>d</sup>
Ácido alfa-linolênico (C18:3n3)	0,092 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,2635 ± 0,0003 <sup>b</sup>	0,225 ± 0,001 <sup>c</sup>	0,323 ± 0,001 <sup>d</sup>
Ácido eicosanóico (C20:0)	0,342 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,2635 ± 0,0003 <sup>b</sup>	0,25 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,271 ± 0,001 <sup>d</sup>
Ácido cis-11-Eicosenóico (C20:1)	0,108 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,106 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,119 ± 0,002 <sup>b</sup>	0,1305 ± 0,0009 <sup>c</sup>
Ácido behênico (C22:0)	0,404 ± 0,006 <sup>a</sup>	0,262 ± 0,002 <sup>b</sup>	0,2015 ± 0,0003 <sup>c</sup>	0,177 ± 0,001 <sup>d</sup>
<b>SFA</b>	<b>52,91 ± 0,04<sup>a</sup></b>	<b>43,89 ± 0,01<sup>b</sup></b>	<b>45,5 ± 0,2<sup>c</sup></b>	<b>44,92 ± 0,04<sup>d</sup></b>
<b>MUFA</b>	<b>37,95 ± 0,03<sup>a</sup></b>	<b>34,92 ± 0,02<sup>b</sup></b>	<b>34,42 ± 0,01<sup>c</sup></b>	<b>36,3 ± 0,1<sup>d</sup></b>
<b>PUFA</b>	<b>9,14 ± 0,01<sup>a</sup></b>	<b>21,19 ± 0,01<sup>b</sup></b>	<b>20,1 ± 0,2<sup>c</sup></b>	<b>18,81 ± 0,01<sup>d</sup></b>

ps – peso seco; nd – não detetado; SFA – *saturated fatty acids* (ácidos gordos saturados); MUFA – *monounsaturated fatty acids* (ácidos gordos monoinsaturados); PUFA – *polyunsaturated fatty acids* (ácidos gordos polinsaturados). Em cada linha letras diferentes significam diferenças significativas entre espécies ( $p < 0,05$ ).

A quantidade de margarina introduzida na formulação dos waffles representa cerca de 26% total da composição do mesmo. Em um estudo realizado por Lopes (2015) consta que os ácidos palmítico, esteárico e oleico estão presentes na composição da margarina e por sua vez, são os ácidos gordos que se apresentam em maiores quantidades. Contudo, pode-se observar que obtivemos um resultado positivo em relação à adição da farinha do mesocarpo de babaçu, visto que a quantidade de SFAs diminui conforme a adição, aumentando o teor de PUFAs.

### 5.3.2.1. Composição em compostos fenólicos

Os dados relativos à composição fenólica do extrato hidroetanólico dos waffles desenvolvidos estão descritos na **Tabela 23**. Assim como foi descrito na **secção 5.1.2**, a

sequência de numeração de picos segue o tempo de retenção de todos os compostos identificados. Todos os compostos identificados nos waffles foram descritos para o extrato hidroetanólico de babaçu, à exceção do pico 9 (assim como no pão) que é proveniente da farinha de trigo.

É visível que nestas amostras foram identificados uma quantidade de compostos muito inferior do que na farinha e pães, isto pode ser devido à temperatura usada durante a cozedura dos waffles que pode ser responsável pela degradação de alguns compostos. As amostras W18 e W24 revelam, no entanto, as maiores concentrações de compostos fenólicos totais, flavan-3-óis, de  $0,47 \pm 0,005$  mg/g extrato, estando os ácidos fenólicos e flavonóides apenas em quantidades vestigiais.

**Tabela 23** - Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do ultravioleta ( $\lambda_{max}$ ), dados de espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação (mg/g extrato) dos compostos fenólicos presentes em extratos hidroetanólicos dos waffles desenvolvidos (média  $\pm$  DP).

Pico	Tr (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	[M-H] <sup>+</sup> (m/z)	Identificação Tentativa	Quantificação (mg/g extrato)			
					W0	W12	W18	W24
1	4,08	280	577	Dímero de (Epi)catequina tipo $\beta$	nd	$0,092 \pm 0,003^c$	$0,115 \pm 0,003^a$	$0,112 \pm 0,001^b$
2	5,76	280	289	(+)-Catequina	nd	$0,118 \pm 0,0004^c$	$0,16 \pm 0,01^b$	$0,6 \pm 0,01^a$
3	7,7	324	341	Hexósido do ácido cafeico	vg	vg	vg	vg
4	7,83	280	289	(-)-Epicatequina	nd	$0,112 \pm 0,003^b$	$0,133 \pm 0,004^a$	$0,133 \pm 0,004^a$
5	9,12	283	1153	Tetramero de (Epi)catequina tipo $\beta$	nd	$0,05682 \pm 0,00004^b$	$0,06453 \pm 0,00204^a$	$0,065 \pm 0,002^a$
9	13,34	342	563	Apigenina-C-pentosil-C-hexósido	vg	vg	vg	vg
<b>Compostos fenólicos totais</b>					<b>vg</b>	<b><math>0,38 \pm 0,03^b</math></b>	<b><math>0,47 \pm 0,01^a</math></b>	<b><math>0,47 \pm 0,01^a</math></b>
<b>Ácidos fenólicos totais</b>					<b>vg</b>	<b>vg</b>	<b>vg</b>	<b>vg</b>
<b>Flavan-3-óis totais</b>					<b>nd</b>	<b><math>0,38 \pm 0,03^b</math></b>	<b><math>0,47 \pm 0,01^a</math></b>	<b><math>0,47 \pm 0,01^a</math></b>
<b>Flavonóis</b>					<b>vg</b>	<b>vg</b>	<b>vg</b>	<b>vg</b>

nd – não detetado; vg – quantidades vestigiais. MS<sup>2</sup> (m/z): pico 1 - 451(100), 575(40),425(5),407(5),289(5),287(10); pico 2 - 325(20), 289 (100), 245(100), 205(41), pico 3 - 179(100),161(34); pico 4 - 325(20), 289 (100), 245(100), 205(41); pico 5 - 865(68),713(20),695(2),577(22),575(40),425(5),407(5),289(5),287(10); e pico 9 - 503(61),473(100),443(18),425(22),383(82),353(39).

### 5.3.3. Propriedades Bioativas

#### 5.3.3.1. Atividade antioxidante e citotoxicidade

Os resultados relativos à atividade antioxidante das diferentes formulações de waffles estão descritos na **Tabela 24**.

**Tabela 24** - Atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos dos waffles desenvolvidos (média  $\pm$  DP, n = 9).

Atividade antioxidante (IC <sub>50</sub> , $\mu\text{g/mL}$ )	W0	W12	W18	W24	Trolox
TBARS	sa	1,90 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	1,3 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	1,04 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	3,7 $\pm$ 0,5 <sup>d</sup>
OxHLIA	sa	373 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	657 $\pm$ 15 <sup>b</sup>	578 $\pm$ 14 <sup>c</sup>	21,8 $\pm$ 0,2 <sup>d</sup>

sa – sem atividade. Os valores de IC<sub>50</sub> correspondem à concentração do extrato que atinge 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância na redução do ensaio de potência. Em cada linha letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Todos os extratos analisados apresentaram excelente atividade antioxidante para o ensaio TBARS, todas com IC<sub>50</sub> abaixo do controlo positivo (Trolox: 3,7  $\pm$  0,5  $\mu\text{g/mL}$ ). No entanto, considerando que quanto menor o valor de EC<sub>50</sub> maior a sua capacidade antioxidante, é possível verificar que as formulações com 18 e 24% apresentaram maior atividade antioxidante (1,3  $\pm$  0,2  $\mu\text{g/mL}$  e 1,04  $\pm$  0,01  $\mu\text{g/mL}$ , respetivamente) relativamente à formulação W12, com 12% de substituição. Esses resultados indicam que a adição da farinha de MB em produtos de pastelaria, como é o caso dos waffles, é válida, mantendo a característica antioxidante encontrada no presente estudo do extrato hidroetanólico do mesocarpo de babaçu.

No ensaio de OxHLIA, as amostras apresentaram alguma atividade antioxidante com um IC<sub>50</sub> entre 373  $\pm$  7  $\mu\text{g/mL}$  e 578  $\pm$  14  $\mu\text{g/mL}$ . No entanto, comparativamente com o controlo positivo (Trolox; 21,8  $\mu\text{g/mL}$ ) as formulações apresentaram baixa capacidade anti-hemolítica. Vale ressaltar que, assim como no pão, não foi identificada atividade antioxidante para a formulação controlo (100% farinha de trigo).

Os resultados obtidos no ensaio de hepatotoxicidade não estão presentes em tabela, pois todos os extratos hidroetanólicos das formulações dos waffles não apresentaram atividade até à concentração máxima testada (400  $\mu\text{g/mL}$ ). Significando isto, que os waffles elaborados nas concentrações de 12, 18 e 24%, bem como a formulação controlo,

não foram tóxicos contra as linhas celulares não tumoral estudadas (VERO e PLP2), e, assim como foi dito anteriormente, é um resultado muito importante numa primeira validação desta farinha para incorporação em matrizes alimentares sem que tal acarrete riscos para a saúde do consumidor.

### 5.3.3.2. Atividade antimicrobiana

Os resultados da atividade antibacteriana dos extratos obtidos a partir dos waffles e suas respectivas substituições da farinha de trigo pela farinha de mesocarpo de babaçu estão descritos na **Tabela 25**.

**Tabela 25** - Atividade antibacteriana (CMI e CMB em mg/mL) das amostras dos waffles desenvolvidos.

Amostra		<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>En. cloacae</i>
W0	CMI	>16	8	>16	>16	>16	>16
	CMB	>16	16	>16	>16	>16	>16
W12	CMI	>16	2	8	0.5	>16	>16
	CMB	>16	4	16	1	>16	>16
W18	CMI	>16	>16	>16	>16	>16	>16
	CMB	>16	>16	>16	>16	>16	>16
W24	CMI	>16	2	>16	1	>16	>16
	CMB	>16	4	>16	2	>16	>16
E211	CMI	4	0.5	1	1	1	2
	CMB	4	0.5	2	2	2	4
E224	CMI	1	2	0.5	0.5	1	0.5
	CMB	1	4	1	1	1	0.5

*B. cereus*: *Bacillus cereus*; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; *L. monocytogenes*: *Listeria monocytogenes*; *E. coli*: *Escherichia coli*; *En. cloacae*: *Enterobacter cloacae*; *S. typhimurium*: *Salmonella Typhimurium*. CMI: Concentração mínima inibitória; CMB: Concentração mínima bactericida. Controlos positivos: E211 (benzoato de sódio) e E224 (metabissulfito de potássio).

De modo geral, as amostras que apresentaram valores de concentração mínima inibitória foram W0, W12 e W24, a amostra W18 não apresentou nenhuma atividade até à concentração máxima testada (16 mg/mL). A amostra W12 foi a que mais se destacou na atividade antibacteriana, contra as bactérias *B. cereus* (2 mg/mL), *L. monocytogenes* (8 mg/mL) e *E. coli* (0,5 mg/mL), sendo esta última inferior ao controlo positivo benzoato de sódio (1 mg/mL), revelando por isso, potencial contra essas estirpes bacterianas. *B. cereus* foi a bactéria que se apresentou como a mais sensível para os extratos analisados

com valores de CMI de 8 mg/mL e 2 mg/mL para as amostras W0 e W12/W24, respectivamente, sendo o mesmo valor do controlo positivo E224 com CMI de 2 mg/mL. Relativamente ao desempenho bactericida, o qual corresponde à concentração mínima de agente antimicrobiano (do produto) que resulta na morte bacteriana, ou seja, a concentração a partir da qual um agente é bactericida, verificou-se que *E. coli*, foi a estirpe mais suscetível, apresentando um CMB de 0,5 mg/mL para o extrato do waffle com 12% de substituição. Através da é também possível constatar que a amostra W12 expressou um maior carácter inibitório e bactericida para a estirpe *E. coli* apresentando valores de CMI de 0,5 mg/mL e CMB de 1 mg/mL, sabe-se que quanto menores e quanto mais próximos forem os valores destas duas variáveis (CMI e CMB), mais potente será a atividade antimicrobiana.

Como citado na **Seção 5.2.3.2**, apesar de existirem diversos estudos com a aplicação da farinha do mesocarpo de babaçu em produtos alimentares, não há relatos de análises antimicrobianas para os mesmos, ressaltando a importância de se realizar estudos mais profundos sobre a aplicação desta PANC em produtos alimentares.

Os resultados obtidos no ensaio da atividade antifúngica não estão presentes em tabela, pois todos os extratos hidroetanólicos das formulações dos waffles não apresentaram atividade até à concentração máxima testada (16 mg/mL). Significando isto, que os waffles elaborados nas concentrações de 12, 18 e 24%, bem como a formulação controlo, não foram eficazes contra as estirpes fúngicas analisadas. Os estudos de literatura sobre a atividade antifúngica de produtos com substituição parcial da farinha de tripo pela farinha de mesocarpo de babaçu são escassos.

## Conclusão e perspectivas futuras



## 6. Conclusão e perspectivas futuras

De acordo com a *American Dietetic Association* (Associação Dietética Americana), a melhor estratégia nutricional para promover a saúde e reduzir o risco de doenças crônicas é a obtenção de nutrientes a partir de uma grande variedade de alimentos. A planta alimentar não convencional estudada no presente trabalho, o babaçu, pode ser considerado como tendo um alto valor nutricional, mas também como fonte promissora de compostos de alto valor adicionado para serem incorporados em produtos alimentares.

A caracterização nutricional do mesocarpo de babaçu incluiu a determinação da humidade, proteínas, gorduras totais, cinzas, hidratos de carbono e valor energético. Os hidratos de carbono foram o macronutriente mais abundante na planta ( $97,75 \pm 0,02$  g/100 g ps), apresentando por isso um alto valor energético ( $399 \pm 1$  kcal/100 g ps), e baixos valores de gordura ( $0,6 \pm 0,2$  g/100 g ps), proteínas ( $0,696 \pm 0,003$  g/100 g ps) e cinzas ( $0,9 \pm 0,2$  g/100 g ps). Foi detetada a presença de frutose e glucose, sendo a frutose a mais abundante ( $0,17 \pm 0,01$  g/100 g ps) e ainda de ácido quínico, málico e cítrico, sendo este último o mais predominante com  $0,166 \pm 0,001$  g/100 g ps. Quanto ao perfil em ácidos gordos, predominaram os ácidos gordos saturados, devido sobretudo à presença de ácido palmítico com  $59,1 \pm 0,3$  %.

No que respeita à composição fenólica do babaçu foi possível identificar nove compostos fenólicos, seis flavan-3-óis (derivados de catequina e epicatequina) e outros três flavonóis *O*-glicosilados derivados de quercetina. O grupo dos flavan-3-óis representa 99% da composição fenólica da farinha de babaçu com ( $211 \pm 4$  mg/g extrato) devido sobretudo à presença do dímero de (epi)catequina tipo  $\beta$  ( $82 \pm 3$  mg/g extrato). Em relação ao potencial bioativo, foi obtido uma ótima atividade antioxidante tanto para o método de TBARS como para OxHLIA, com valores de  $IC_{50}$  de  $0,0131 \pm 0,0001$   $\mu$ g/mL e  $5,4 \pm 0,01$   $\mu$ g/mL, respectivamente, valores inferiores aos controlos positivos utilizados.

A farinha do mesocarpo de babaçu apresentou resultados positivos para a inibição de todas as linhas celulares cancerígenas testadas o que demonstra que tal extrato pode ser uma promissora fonte de novos agentes antineoplásicos. No entanto, observou-se igualmente a inibição de células saudáveis das linhas celulares PLP2 e VERO, o que indica que este extrato apresenta alguma hepatotoxicidade. Seria interessante prosseguir o estudo da composição detalhada deste extrato, proceder ao fracionamento, isolamento e identificação dos compostos presentes no extrato como forma a entender melhor a ação

e potencial deste tipo de extrato. O resultado de atividade anti-inflamatória testadas na linha celular de macrófagos de rato RAW 264.7, apresentou resultados com concentração superiores à concentração máxima testada, não sendo efetivo seu efeito anti-inflamatório. O extrato testado foi capaz de promover ações bactericidas e bacteriostáticas satisfatórias para todos os microrganismos presentes no painel, especialmente para as estirpes de *B. cereus* e *En. cloacae*, de ressaltar que estes resultados foram inferiores aos controles positivos utilizados. No entanto, não foi eficaz contra as estirpes fúngicas analisadas.

Tendo em vista a possível aplicação industrial, foram desenvolvidos produtos de panificação (pães) e de pastelaria (waffles) com substituições de 12, 18 e 24% da farinha de trigo pela farinha de babaçu, comparando os resultados obtidos com produtos 100% farinha de trigo. Em ambos os produtos, foi notória a melhoria nutricional, química e bioativa dos produtos fortificados com farinha de babaçu.

No geral, a formulação B24 foi a que apresentou maior semelhança ao pão controle (B0), relativamente à aspectos nutricionais, no entanto em relação aos parâmetros físicos foi o que apresentou maior discrepância, sobretudo no volume específico, textura e parâmetro de cor  $L^*$  (luminosidade) tendendo para uma coloração mais escura e opaca. Visto que a coloração da farinha do babaçu não se degrada com o tratamento térmico e confere um diferencial nos produtos fortificados, o mesmo foi observado na formulação W24 dos waffles.

Todos os pães desenvolvidos apresentaram maiores percentagens de envelhecimento nos três primeiros dias de elaboração, porém, a formulação B24 foi a que apresentou menor percentagem (70%) de envelhecimento no total dos 7 dias. Este comportamento foi diferente em relação aos waffles, a formulação que menos envelheceu foi a formulação controle (21%). Relativamente ao peso e volume dos waffles não houve muitas variações, no entanto, o volume específico apresentou um decréscimo de aproximadamente 28% comparativamente da formulação W0 para W24. Todos os waffles apresentaram  $L^*$  (luminosidade) inferior a 60, no entanto a coloração do waffle com 24% de MB foi a que mais se aproximou à coloração original do mesocarpo de babaçu.

Os extratos hidroetanólicos dos pães e waffles revelaram ótima capacidade de inibição da peroxidação lipídica, com valores inferiores ao controle positivo utilizado, o que era expectável, visto que o extrato da farinha também apresentou um ótimo resultado

para esta mesma análise, no entanto ambos os produtos revelaram baixa capacidade anti-hemolítica, comparativamente com o controlo positivo. Apesar de o extrato da farinha ter apresentado características hepatotóxicas, nenhuma das formulações apresentou atividade, sendo um resultado muito importante numa primeira validação desta farinha na incorporação em matrizes alimentares. Os resultados obtidos para a atividade antimicrobiana dos produtos revelaram que possuem alguma atividade antibacteriana, mais notoriamente contra as estirpes *B. cereus* e *E. coli*.

Este estudo permitiu apresentar resultados inovadores em relação à caracterização nutricional, química e propriedades bioativas da farinha do mesocarpo do babaçu e dos produtos de panificação e pastealaria fortificadas com a mesma. Com os resultados verdadeiramente promissores obtidos, a farinha do mesocarpo de babaçu poderá estar na linha da frente de novos produtos da sociobiodiversidade para uso alimentar, possibilitando a oferta diversificada de produtos.

### **Como perspectivas futuras deste trabalho seria importante o estudo da(s):**

- ❖ Capacidade de absorção de água (AA) do MB, relativamente ao crescimento dos pães, sobretudo ao aprisionamento dos gases que são produzidos durante a fermentação;
- ❖ Capacidade de absorção de gordura (AG) do MB, tendo em vista que as formulações em que foi adicionado MB apresentaram menores teores de SFAs e maiores teores de PUFAs;
- ❖ Quantificação do valor de fibras totais – solúvel e insolúvel do MB e dos produtos elaborados;
- ❖ Determinação do pH, pois é fator de grande importância na limitação da capacidade de desenvolvimento de microrganismos no alimento e que contribui para definir procedimentos tecnológicos com vista a conservação;
- ❖ Determinação da acidez, pois representa o estado de conservação das farinhas, não somente no aspecto económico, através de perdas devido à diminuição da vida de prateleira, mas também pela redução da aceitabilidade desses produtos pelos consumidores através de mudanças de cor e sabor, envolvendo tanto aspectos químicos como microbiológicos;
- ❖ Análise microbiológica do MB e dos produtos elaborados e suas condições de armazenamento;
- ❖ Análise sensorial dos produtos elaborados;
- ❖ Utilização de emulsificantes para a estabilização da interface entre os gases e a massa;
- ❖ Propriedades tecnológicas do amido das farinhas e das fibras;
- ❖ Digestibilidade *in vitro*, para avaliar a qualidade da proteína e do amido no processo digestivo.

## 7. Referências

- AACC. (2001). American Association of Cereal Chemists. Approved methods: 10-05; 74-09.01. Saint Paul, 1983-2001.
- Abdel-Aal, E.-S. M., Hucl, P., Shea Miller, S., Patterson, C. A., & Gray, D. (2011). Microstructure and nutrient composition of hairless canary seed and its potential as a blending flour for food use. *Food Chemistry*, 125(2), 410–416.
- Adhikari, P.; Hwang, K.T.; Shin, M.K.; Lee, B.K.; Kim, S.K.; Kim, S.Y. (2008). Tocols in caneberry seed oils. *Food Chem*;111(1):687-90.
- Adwan, G., Mhanna, M. (2008) Synergistic effects of plant extracts and antibiotics on *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical specimens. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 3, 134-139.
- Ahn, E.-Y., Jin, H., & Park, Y. (2019). Assessing the antioxidant, cytotoxic, apoptotic and wound healing properties of silver nanoparticles green-synthesized by plant extracts. *Materials Science and Engineering: C*, 101, 204–216. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.095>
- Aleksenko, S. S. (2013). Antioxidant activity and phenolic compounds of buckwheat and barley by the data of spectrophotometry and HPLC. *Journal of Analytical Chemistry*, 68(5), 458-465.
- Al-Hussaini, R., Mahasneh, A.M. (2009). Microbial growth and quorum sensing antagonist activities of herbal plants extracts. *Molecules*, 14,3425-3435.
- American Dietetic Association (1996). *J. Am. Dietetic Association*, 96, 73.
- Andrade, B. A., Perius, D. B., Mattos, N. V. D., Luvielmo, M. D. M., & Mellado, M. S. (2017). Produção de farinha de banana verde (*Musa spp.*) para aplicação em pão de trigo integral. *Brazilian Journal of Food Technology*, 21.
- Angelo, P. M., & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 66, 1–9.
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S. & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198.

- AOAC. (2016). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (20th ed). W. George.
- Araújo, H. M. C. Impacto da doença celíaca na saúde, nas práticas alimentares e na qualidade de vida de celíacos. 2008. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em Nutrição Humana, Universidade de Brasília, DF
- Azevedo, H. I. V. (2014). Composição química da folha e do caule de *Calamintha baetica*. Efeito do solvente na extração de compostos antioxidantes. <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/11582>
- Bandeira, M. A. M. et al. (1986). Contribuição ao estudo químico do coco babaçu. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Curitiba, v.1, p 27-28.
- Barros, L., Pereira, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Optimized Analysis of Organic Acids in Edible Mushrooms from Portugal by Ultra-Fast Liquid Chromatography and Photodiode Array Detection. *Food Analytical Methods*, 6(1), 309–316. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9443-1>
- Batista, C.L., Torres, O.J.M., Matias, J.M.F., Moreira, A.T.R., Colman, D., Lima, J.H.F., Macri, M.M, Rauen Jr., R.J., Ferreira, L.M., Freitas, A.C.T. (2006) Effect of watery extract of *Orbignya phalerata* (babassu) in the gastric healing in rats: morfologic and tensiometric study. *Acta Cirúrgica Brasileira*.
- Belitz, H.; Grosch, W.P.; Hessel, C.; Sprinz, S.; M., Jordan; Burghagen, E. (1999). *Food Chemistry*. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag - Vol. 2 ed..
- Biswas, K. R., & Rahmatullah, M. (2011). A Survey of Non-conventional Plants Consumed During Times of Food Scarcity in Three Adjoining Villages of Narail and Jessore Districts, Bangladesh. 5.
- Bockisch, M. (1998). *Fats and Oils Handbook*. Alemanha : The Burlington Magazine.
- Borges, J. T. S., Paula, C. D., Piroz, M. R., & Oliveira, K. (2012). Qualidade nutricional de pão de forma enriquecido com farinha de quinoa. 21.
- BRASIL. Instrução Normativa MAPA nº 8, de 3 de junho de 2005. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Farinha de Trigo. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 03 jun. 2005. Seção 1.

- BRASIL. Resolução CNNPA no 12, de 1978. ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária 49–51 (1978). Brasil.
- BRASIL. Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. Aprova o “Regulamento técnico produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos” constante do anexo desta Resolução. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária Disponível em: [legis.anvisa.gov.br/leisref/public](http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public) >.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (2015). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. John Wiley & Sons.
- Calbo, A. G.; Moretti C. L. e Henz, G. P. (2007). *Respiração de Frutas e Hortaliças*. Brasília : Comunicado Técnico. - Vol. 46.
- Camili, E. A., & Copini, P. (2019). Efeito Da Farinha De Babaçu Nas Característica Físico-Químicas E Sensorias Do Biscoito Sequilho. Efeito Da Farinha De Babaçu Nas Característica Físico-Químicas E Sensorias Do Biscoito Sequilho, 1-388. DOI: 10.22533/at.ed.8691926044
- Carneiro, M. I. F.; Sakomura, N. K.; Kawauchi, I. M.; Silva, E. P.; Araujo, J. A.; Fernandes, J. B. K.; Gomes Filho, J. S. (2013). Avaliação do mesocarpo de babaçu na alimentação de frangos de corte. Jaboticabal, São Paulo, Brasil : ARS Veterinária, Vols. 229, n3.
- Carocho, M., Barros, L., C. Calhelha, R., Ćirić, A., Soković, M., Santos-Buelga, C., Morales, P., & R. Ferreira, I. C. F. (2015). Melissa officinalis L. decoctions as functional beverages: A bioactive approach and chemical characterization. *Food & Function*, 6(7), 2240–2248. <https://doi.org/10.1039/C5FO00309A>
- Carrazza, L. R., Silva, M. L. da, Ávila, J. C. C. (2012). *Manual Tecnológico de Aproveitamento Integral do Fruto do Babaçu*. Instituto Sociedade, População e Natureza. - Brasília – DF.
- Cavalcante Neto, A. A., Soares, J. P., Pereira, C. T. M., Gomes, M. S. S. O., & Sabaasrur, A. U. O. (2016). Utilização de farinha de mesocarpo de babaçu (*Orbignya* sp.) no preparo de massa alimentícia fresca tipo talharim. *Brazilian Journal of Food Research*.

- Celi, P. (2010). O papel do estresse oxidativo na saúde e produção de pequenos ruminantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39 (suplemento especial), p. 348-363.
- Chaitra, U.; Abhishek P.; Sudha, M. L.; Vanitha, T.; Crassina, K. (2020). Impact of millets on wheat based Belgian waffles: Quality characteristics and nutritional composition, *LWT*, Volume 124, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109136>.
- Chen, L., Gnanaraj, C., Arulselvan, P., El-Seedi, H., & Teng, H. (2019). A review on advanced microencapsulation technology to enhance bioavailability of phenolic compounds: Based on its activity in the treatment of Type 2 Diabetes. *Trends in Food Science & Technology*, 85, 149-162.
- Chow, C. K. (2007). *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*, CRC Press. Third Edition.
- Clere, N. et al. (2011). Anticancer properties of flavonoids: roles in various stages of carcinogenesis. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Cardiovascular & Hematological Agents)*, v.9, n 2, p 62 – 77.
- Costa, M., Souza, E. L. de, Stamford, T. L. M., & Andrade, S. A. C. (2008). Technological quality of national and imported wheat grain and wheat flours. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(1), 220–225. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000100031>
- Costa, Tainara & Jorge, Neuza (2011). Compostos Bioativos Benéficos Presentes em Castanhas e Nozes. Artigo de revisão. *Engenharia e Tecnologia de Alimentos*. Universidade Estadual Paulista (USP).
- Cox, M. e Lehninger D. N. (2004). *Principles of Biochemistry*. Vol. 4th ed. 1100 p.
- Czaja-Bulsa, G. (2015). Non coeliac gluten sensitivity – A new disease with gluten intolerance. *Clinical Nutrition*, 34(2), 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2014.08.012>
- Da Silva, B. P.; Parente, J. P. N. (2001). Anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. *Fitoterapia*, Amsterdam, v. 72, p 887-893, (EMBRAPA – SPI), 1994. v. 6.

- Dauda, A.O., Abiodun, O.A., Arise, A.K., Oyeyinka, S.A. (2018). Nutritional and consumers acceptance of biscuit made from wheat flour fortified with partially defatted groundnut paste. *LWT - Food Science and Technology*.
- de Carvalho Silva, N., do Carmo BARROS, E. K., PEREIRA, A. L. F., de Oliveira Lemos, T., & ABREU, V. K. G. (2019). Effect of Babassu (*Orbignya phalerata*) Mesocarp Flour on the Sensorial Properties and Nutritional Value of Cookies. *Journal of Food and Nutrition Research*.
- de Menezes Pavlak, M. C., Zuniga, A. D., Lima, T. L. A., Arévalo-Pinedo, A., Carreiro, S. C., Fleury, C. S., & Silva, D. L. (2007). Aproveitamento da farinha do mesocarpo do babaçu (*Orbignya martiana*) para obtenção de etanol. *Evidência*, 7(1), 7-24.
- EFSA. (2020). The public health risk posed by *Listeria monocytogenes* in frozen fruit and vegetables including herbs, blanched during processing. *The EFSA Journal*, 34, 34, 1-14.
- El-Dash, A., & Germani, R. (1994). *Tecnologia de farinhas mistas*. V. 6; uso de farinhas mistas na produção de biscoitos.
- Elizabeth S. B. Barroqueiro, Dayanna S. Prado, Priscila S. Barcellos, Tonicley A. Silva, Wanderson S. Pereira, Lucilene A. Silva, Márcia C. G. Maciel, Rodrigo B. Barroqueiro, Flávia R. F. Nascimento, Azizedite G. Gonçalves, Rosane N. M. Guerra, (2016). "Immunomodulatory and Antimicrobial Activity of Babassu Mesocarp Improves the Survival in Lethal Sepsis", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2016/2859652>
- EMBRAPA (2001). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, vinculada ao Ministério da Agricultura. *Babaçu: Programa Nacional de Pesquisa*: Brasília.
- Enioutina, E. Y., Teng, L., Fateeva, T. V., Brown, J. C., Job, K. M., Bortnikova, V. V., Krepkova, L. V., Gubarev, M. I., Sherwin, C. M. (2017). Phytotherapy as an alternative to conventional antimicrobials: combating microbial resistance. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 10, 1203-1214
- Esteller, M. S.; Lannes, S. C. S. (2005). Parâmetros complementares para fixação de identidade e qualidade de produtos panificados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 4, p. 802-806.

- EUA. (2002). Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). Institucional. <<http://www.cfsan.fda.gov>>
- Evangelho, J.A., Pinto, V. Z., Zavareze, R. E., Vanier, L. N., Dias, A. R. G., Barbosa, L. M. P. B. (2012). Propriedades tecnológicas e nutricionais de pães preparados com diferentes proporções de farinha de arroz e Farinha de arroz extrusada. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 18, n.4, p. 264-282.
- FAO, Food and Agriculture Organisation of the United Nations (2009). Staple Foods: what Do People Eat <<http://www.fao.org/docrep>>
- Ferreira, F. A. B. (2001). Uso de um “pool” de antibióticos, ácidos orgânicos e mananoligossacarídeos na alimentação de frangos de corte. Universidade Federal do Paraná, Paraná.
- Ferreira, P. R. B et. al. (2010). Caracterização físico-química do mesocarpo de babaçu (*Orbignya sp*) de regiões do Piauí. *Anais do XIX Seminário de Iniciação Científica da UFPI*.
- Gan, R.-Y., Lui, W.-Y., Wu, K., Chan, C.-L., Dai, S.-H., Sui, Z.-Q., & Corke, H. (2017). Bioactive compounds and bioactivities of germinated edible seeds and sprouts: An updated review. *Trends in Food Science & Technology*, 59, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.010>
- Gao, Y., Janes, M. E., Chaiya, B., Brennan, M. A., Brennan, C. S., & Prinyawiwatkul, W. (2018). Gluten-free bakery and pasta products: Prevalence and quality improvement. *International Journal of Food Science & Technology*, 53, 19–32. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13505>
- García, M. M., Menéndez-conde C. P. e Vicedo T. B. (2011). Avances en el conocimiento del uso de micronutrientes en nutrición artificial. *Nutrición Hospitalaria*. *Nutrición Hospitalaria - Vol. 26*.
- García-Lafuente, A. et al. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*, v. 58, n. 9, p 537-552.
- Garcia-Pastor, P., Randazzo, A., Gomez-Paloma, L., Alcaraz, M. J., & Paya, M. (1999). Effects of petrosaspongiolide M, a novel phospholipase A2 inhibitor, on acute and

chronic inflammation. *Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics*, 289(1), 166-172.

Gateva, S., Jovtchev, G., Stankov, A., Georgieva, A., Dobрева, A., & Mileva, M. (2019). The potential of geraniol to reduce cytotoxic and genotoxic effects of MNNG in plant and human lymphocyte test-systems. *South African Journal of Botany*. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.03.005>

Gill, S., Vasanthan, T., Oraikul, B., & Rossnagel, B. (2002). Wheat Bread Quality as Influenced by the Substitution of Waxy and Regular Barley Flours in Their Native and Extruded Forms. *Journal of Cereal Science*, 36(2), 219–237. <https://doi.org/10.1006/jcrs.2001.0458>

Household Food Consumption and Expenditure (1987). Annual Report of the National Food Survey Committee 1949-1987. HMSO, London.

Hunter, Richard S.; Harold, Richard W. The measurement of appearance. New York: John Wiley & Sons, 1987. 411 p.

Ide, T., Tsutsui, H., Hayashidani, S., Kang, D., Suematsu, N., Nakamura, K., Utsumi, H., Hamasaki, N., & Takeshita, A. (2001). Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circulation research*, 88(5), 529–535.

Instituto De Pesquisas Tecnológicas Do Estado De Sao Paulo. Projeto babaçu integral - PROMOCET, 1980. 139p.

Islam, T., Chowdhury, A., Islam, M., & Islam, S. (2007a). Standardization of bread preparation from soy flour. *International Journal of Sustainable Crop Production*.

Jang, S. P. et al. (2017). Atypical Femoral Shaft Fractures in Female Bisphosphonate Users Were Associated with an Increased Anterolateral Femoral Bow and a Thicker Lateral Cortex: A Case-Control Study. *BioMed Research International*, 2017, pp. 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.021>

Jones, D. L. (1998). *Organic acids in the rhizosphere [s.l.] : Plant and Soil*. 1st Ed.

- Kac, G. & Velásquez-Meléndez, G. (2003) - A transição nutricional e a epidemiologia da obesidade na América Latina. *Cadernos de Saúde Pública*, vol.19, n. sp. 1, p. 4-5.
- Kelen, Marília Elisa Becker, et al. 2015. Plantas alimentícias não convencionais PANCs: Hortaliças espontâneas e nativas. Organização de Marília Elisa Becker Kelen et al. - 1. ed. Porto Alegre: UFRGS.
- Kinupp, V. F., & Barros, I. B. I. (2004). Levantamento De Dados E Divulgação Do Potencial Das Plantas Alimentícias Alternativas No Brasil. 22(2), 4.
- Kinupp, V.F. & Lorenzi, H. (2014) - Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda.
- Kinupp, V.F. (2007). Plantas Alimentícias Não-Convencionais da Região Metropolitana de Porto Alegre, RS. Porto Alegre, 2007. 562 p. <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/12870>
- Köhler, M., & Brack, P. (2016). Frutas nativas no Rio Grande do Sul: cultivando e valorizando a diversidade. *Revista Agriculturas*, 13(2).
- Leal, M. L. (2015). Conhecimento e uso de plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Ribeirão da Ilha–Florianópolis/SC. Repositório Institucional UFSC. <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/174789>
- Lee, C. Y.; Shallenberger, R. S.; Vittum, M. T. (1970). Free sugars in fruits and vegetables. *New York's Food and Life Sciences Bulletin*.
- Liu, Q., Qiu, Y., & Beta, T. (2010). Comparison of antioxidant activities of different colored wheat grains and analysis of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 9235-9241.
- Liu, R.H. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal Cereal Scienc*, 46(3).
- Lopes, Í. K. B. (2015). Avaliação físico-química e química dos óleos e gorduras e seus efeitos na ingestão in vivo.
- Lorenzi, H. (2010). Flora Brasileira Lorenzi: Arecaceae (palmeiras). - São Paulo : Nova Odessa- Vol. 367 p.

- Machado, L. P.; Kohayagawa, A.; Saito, M. E.; Silveira, V.F. Da; Yonezawa, L. A. (2009). Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse em Medicina Veterinária. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 8, n. 1, p. 84-94.
- Mahan LK, Escott-Stump S. (2010). *Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia*. São Paulo: Roca.
- Maia, M. B. S.; Rao, V. S. (1989). Anti-inflammatory activity of *Orbignya phalerata* in rats. *Phytotherapy Research, Oxford*, v. 3, n. 5, p 170-174.
- Maniglia, B. C.; Tápia-Blácido, D. R. (2016). Isolation and characterization of starch from babassu mesocarp. *Food Hydrocolloids, Amsterdam*. V55, p. 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.11.001>.
- MAPA (2010). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. *Hortaliças Não-Convencionais*. Brasília.
- MAPA (2021). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Portaria Interministerial MAPA/MMA nº 10, de 21 de julho de 2021. Brasília.
- Marinho, R. M. O., Amaral, S. M. B., da Silva, F. S., de Almeida, A. P. F., Silva, Y. Y. V., de Oliveira, A. T. C., Silva, F. T. S., Azevedo, R. C. T., Dantas, B.S., Medeiros, M. M. L. & Damaceno, M. N. (2021). Elaboração e avaliação de pão integral enriquecido com farinha de banana verde. *Brazilian Journal of Development*, 7(9), 89421-89434.
- Martins, D. F., Turnes, B. L., Cidral-Filho, F. J., Bobinski, F., Rosas, R. F., Danielski, L. G., ... & Santos, A. R. S. (2016). Light-emitting diode therapy reduces persistent inflammatory pain: Role of interleukin 10 and antioxidant enzymes. *Neuroscience*, 324, 485-495.
- Melgar, B., Dias, M. I., Ciric, A., Sokovic, M., Garcia-Castello, E. M., Rodriguez-Lopez, A. D. & Ferreira, I. C. (2018). Bioactive characterization of *Persea americana* Mill. by-products: A rich source of inherent antioxidants. *Industrial Crops and Products*, 111, 212-218.

- Melo Filho, A. B.; Vasconcelos, M. A. S. (2011) *Química de alimentos*. 78 p. Recife: UFRPE.
- Melo, E. de A., Maciel, M. I. S., Lima, V. L. A. G. de, & Nascimento, R. J. do. (2008). Capacidade antioxidante de frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol 44,193–201.
- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF). (1987) National Food Survey Committee.
- Mintel, (2018). *Tendências Globais em Alimentos e Bebidas*. Brasil Intel Imprensa.
- Morales, E. M. (2012). Viabilidade de obtenção de alimento funcional a base de farinha de mesocarpo de babaçu (*Orbignya sp.*) e folhas de mandioca (*Manihot esculenta*) mediante 62 fermentação por *Rhizous microsporus* var. *oligosporus*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada).- Universidade Estadual Paulista, Rio Claro –SP.
- Multhoff, G., Molls, M., & Radons, J. (2012). Chronic inflammation in cancer development. *Frontiers in immunology*, 2, 98.
- Neffati, N., Aloui, Z., Karoui, H., Guizani, I., Boussaid, M., & Zaouali, Y. (2017). Phytochemical composition and antioxidant activity of medicinal plants collected from the Tunisian flora. *Natural product research*, 31(13), 1583-1588.
- Negi, P. S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 156, Issue 1, Pages 7-17, ISSN 0168-1605, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006>.
- Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A., & Yar, M. S. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010>
- Nionelli, L., Wang, Y., Pontonio, E., Immonen, M., Rizzello, C. G., Maina, H. N., Katina, K., & Coda, R. (2020). Antifungal effect of bioprocessed surplus bread as ingredient for bread-making: Identification of active compounds and impact on shelf-life. *Food Control*, 118, 107437. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107437>

- Nogala-Kalucka M, Korczak J, Dratwia M, Lampsrt-Szczapa E, Siger A, Buchowski M. (2005) Changes in antioxidant activity and free radical scavenging potential of rosemary extract and tocopherols in isolated rapeseed oil triacylglycerols during accelerated tests. *Food Chem*; 93:227-35.
- Oliveira, A. C. (2008). Capacidade antioxidante de farinhas de resíduos de frutas tropicais. *Ciências da Saúde*. Universidade Federal de Alagoas, Maceió.
- Oliveira, J., de Souza, N. T., & Polesi, L. F. (2020). Elaboração de massa alimentícia sem glúten a partir de farinha de babaçu e pupunha. DOI:10.37885/200800849
- Oliveira, N. A. D. (2018). Caracterização da farinha do mesocarpo e do óleo das amêndoas de Babaçu (*Orbignya phalerata*, Mart.) obtidos via extração com fluído supercrítico e líquido pressurizado: estudos pré-clínicos e toxicológicos (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Pallarés, M. G.; León, A. L.; Rosell, C. M. - Trigo. In: León, A. L.; Rosell, C. M (2007). *De tales harinas tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica*. 1ª ed. Córdoba: Hugo Baéz Editor. 17-27. I
- Perez, P. M. P.; Germani, R. (2004). Farinha mista de trigo e berinjela: características físicas e químicas. *Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, Paraná*, v. 22, n. 1.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz-Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food research international*, 41(3), 274-285.
- Perini, L., Stevanato, B., Cyl, S., Eliete, J., Visentainer, L., Dalalio, O., Estadual, U. (2010). Ácidos graxos poliinsaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune.
- Pires, F. C. (2016). Estudo das condições de secagem do mesocarpo do babaçu para obtenção de farinha e aplicação na produção de bolos.
- Pires, T.C.S.P.; Dias, M.I.; Barros, L.; Alves, M.J.; Oliveira, M.B.P.P.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I.C.F.R. (2018). Antioxidant and antimicrobial properties of dried

- Portuguese apple variety (*Malus domestica* Borkh. cv Bravo de Esmolfe). *Food Chem.* 240, 701–706.
- Purhagen, J.K. et al. (2012). Fibre-rich additives: the effect on staling and their function in free-standing and pan-baked bread. *Journal of Science and Food Agriculture*, v.92, p.1201- 1213.
- Rajkovic A (2014) Microbial toxins and low level of foodborne exposure. *Trends in Food Science and Technology*; 38: 149-157.
- Rennó, M. N., Barbosa, G. M., Zancan, P., Veiga, V. F., Alviano, C. S., Sola-Penna, M., ... & Holandino, C. (2008). Crude ethanol extract from babassu (*Orbignya speciosa*): cytotoxicity on tumoral and non-tumoral cell lines. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 80, 467-476.
- Ribatejo, A. (2015). Tendências Do Mercado Alimentar Da União Europeia. *Agrocluster Portugal*, 67.
- Ribeiro, Eliana Paula; Seravalli, Elisena A. G. (2007). *Química de Alimentos*. 2ª. ed. São Paulo: Blucher. 184 p.
- Ruiz, G. V., (2009). Proteínas de la harina de trigo: clasificación y propiedades funcionales. *Temas de ciencia y tecnologia*. 13,38, 27-32.
- Sánchez, E., García, S., & Heredia, N. (2010). Extracts of Edible and Medicinal Plants Damage Membranes of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(20), 6888–6894. <https://doi.org/10.1128/AEM.03052-09>
- Santana, M., Gonçalves, L., & Oliveira, C. (2007). Caracterização química e sensorial de biscoitos enriquecidos com farinha de mesocarpo de babaçu. In Embrapa Amazônia Oriental-Resumo em anais de congresso (ALICE). In: Simpósio Latino-Americano De Ciência De Alimentos, Campinas. Ciência e tecnologia de alimentos em benefício a sociedade: ligando a agricultura à saúde: resumos. Campinas: SBCTA: Unicamp/FEA.
- Santos, A. A. dos. (2013). Avaliação da bioatividade e caracterização química de uma espécie medicinal de uso tópico: *Juglans regia* L. Tese de Mestrado, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.

- Santos, J. S. dos, Santos, M. L. P. dos, & Azevedo, A. dos S. (2014). Validação de um método para determinação simultânea de quatro ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência em polpas de frutas congeladas. *Química Nova*, 37, 540–544.
- Sapiência. (2010). O potencial do babaçu. Teresina, Piauí. Informativo da FAPEPI. 26 Ed.
- Shah, D., Sajjad, N., Ali, R., & Nazir, N. (2019). Sugar Regulates Plant Growth and Development Under In Vitro Conditions. *Plant Signaling Molecules*. Elsevier Inc.
- Shen, Y., Chen, G., & Li, Y. (2018). Bread characteristics and antioxidant activities of Maillard reaction products of white pan bread containing various sugars. *LWT*, 95, 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.008>
- Shergill-Bonner R. (2013). *Micronutrients: Paediatrics and Child Health - Vols. 23*, 331-336.
- Shimamura, T., Zhao, W., & Hu, Z.-Q. (2007). Mechanism of Action and Potential for Use of Tea Catechin as an Antiinfective Agent. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry - Anti-Infective Agents)*, 6, 57–62.
- Silva, G. L. et al. (2007). Avaliação físico-química da farinha de mesocarpo de babaçu (*Orbignya spp.* Mart.), comercializada em municípios do estado do maranhão. *Higiene Alimentar*, v.21, n.157, p.86-89.
- Simeone M.L.F., Henrique G.S. (2019). A Farinha do Mesocarpo do Babaçu (*Orbignya Phalerata*) como Componente de uma Mistura Protéica em dietasemi-Purificada e seus Reflexos sobre a colesterolemia e a Trigliceridemia em ratos. Brasília, Embrapa.
- Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, vol 15.
- Sobral F, Sampaio A, Falcão S, Queiroz MJR, Calhella RC, Vilas-Boas M, Ferreira IC (2016) Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of bee venom collected in Northeast Portugal. *Food Chem Toxicol* 94:172–177

- Soethe, C., Steffens, C. A., Amarante, C. V. T. do, Martin, M. S. D., & Bortolini, A. J. (2016). Qualidade, compostos fenólicos e atividade antioxidante de amoras-pretas “Tupy” e “Guarani” armazenadas a diferentes temperaturas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol 51, 950–957.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L. Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., Magrini, N. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*, 18, 318-32
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199–1218. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>
- Takebayashi, J., Iwahashi, N., Ishimi, Y., & Tai, A. (2012). Development of a simple 96-well plate method for evaluation of antioxidant activity based on the oxidative haemolysis inhibition assay (OxHLIA). *Food Chemistry*, 134(1), 606–610. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.086>
- Tebben, L., Shen, Y., & Li, Y. (2018). Improvers and functional ingredients in whole wheat bread: A review of their effects on dough properties and bread quality. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.015>
- Teixeira, Marcos Alexandre; Carvalho, Maria da Graça. (2007). Regulatory mechanism for biomass renewable energy in Brazil: a case study of the brazilian babassu oil extraction industry. *Energy*. Lisboa - Pt, p. 999-1005.
- Vallarino, J. G., & Osorio, S. (2019). *Organic Acids. Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00010-5>
- Vaughan, J. G. (1997). *O Novo Livro de Plantas Alimentícias de Oxford*. Oxford University Press, Nova Iorque, p. 196.

Vieira, L. M., Sousa, M. S., & Lima, A. D. (2011). Compostos fenólicos e atividade antioxidante do extrato etanólico do mesocarpo do coco babaçu (*Orbignya speciosa*). *Nutrire*, 36(Suplemento), 167-167.

Vilhalva, D. A. A., Soares Júnior, M. S., Lima, C. M. A. D. M., Caliari, M., Souza, T. A. C., & Silva, F. A. D. (2011). Aproveitamento da farinha de casca de mandioca na elaboração de pão de forma.

Wade, L.G. (1999). *Organic chemistry*, Prentice-Hall.