



# **Desenvolvimento de *cupcakes* proteicos sem glúten com aplicação de um corante natural de pitaia e farinhas de leguminosas**

**Fernanda Carolina Pompeu Menegoli**

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

Orientado por:

**Doutor Custódio Lobo Roriz**

**Doutora Lillian Bouçada de Barros**

**Professora Doutora Nadia Cristiane Steinmacher**

**Bragança**

**2024**



Este trabalho foi financiado pelo programa FFEDER Cooperación Interreg VI A Espanha – Portugal (POCTEP) 2021-2027 for financial support through the project TRANSCoLAB PLUS 0112\_TRANSCOLAB\_PLUS\_2\_P.



## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, expresso minha profunda gratidão à minha família, especialmente ao meu pai, José Antonio, e à minha mãe, Vitória Vania (*in memoriam*), pelo apoio e incentivo incondicionais ao longo de todos os meus anos de estudo. Sem a dedicação e a ajuda de ambos, não teria alcançado os meus objetivos. Agradeço também ao meu tio, Nelson Pompeu (*in memoriam*), que, mesmo não estando mais presente, continua sendo a minha maior inspiração para a escolha do curso de Bacharelado em Engenharia de Alimentos e, posteriormente, para a realização do mestrado em Segurança e Qualidade Alimentar.

Aos meus orientadores, Doutor Custódio Lobo Roriz, Doutora Lillian Barros e Doutora Nádia Cristiane Steinmacher, expresso meus sinceros agradecimentos pela orientação criteriosa, paciência e dedicação ao longo deste trabalho. Agradeço pela oportunidade de expandir meus conhecimentos e habilidades sob a orientação de profissionais tão competentes e excepcionais.

Estendo meus agradecimentos aos meus amigos Akira Narita, Carlos Alcantara, Vitória Cristina, Gabriela Ferrari e Angelo Piliero, cujo apoio constante e incentivo foram essenciais durante todo este período.

Ao projeto TRANSCOLAB PLUS e à empresa Molendum Ingredients, expresso o meu mais sincero agradecimento pela valiosa contribuição e pelo apoio prestado a este estudo, concretizado através da doação das farinhas de leguminosas. Destaco ainda o cuidado e a atenção dedicados à preparação das farinhas, cuja excelente qualidade foi determinante para o sucesso deste estudo.

Agradeço, ainda, à Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) de Medianeira e ao Instituto Politécnico de Bragança (IPB) pela oportunidade de participar do programa de dupla diplomação. Sou extremamente grata pelo acolhimento de ambas as instituições, que me proporcionaram um ambiente acadêmico incrível e excelentes professores, aos quais devo um agradecimento sincero e profundo.

## RESUMO

Nos últimos anos, o uso de ingredientes e aditivos alimentares tornou-se uma preocupação crescente na indústria alimentar, em resposta às exigências dietéticas específicas dos consumidores, especialmente daqueles que lidam diariamente com condições como a doença celíaca, intolerâncias alimentares e alergias. Como consequência, tem-se verificado uma tendência crescente no desenvolvimento de novos produtos alimentares alternativos, utilizando matérias-primas anteriormente consideradas como irrelevantes ou subestimadas. Entre estas, as farinhas de leguminosas têm ganho destaque, proporcionando à indústria de pastelaria e panificação alternativas isentas de glúten, ricas em nutrientes e de baixo teor glicêmico, para a aplicação nos mais diversos produtos. Associadas a essas farinhas, os corantes naturais provenientes de frutas como a pitaia, têm sido também amplamente explorados, tornando-se opções seguras para aqueles que procuram evitar os potenciais efeitos adversos proporcionados pelos corantes artificiais. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo a elaboração de um *cupcake* isento de glúten e alérgenos derivados do leite e ovos, a partir de farinhas de leguminosas, com recurso à aquafaba e ao corante natural extraído da casca da pitaia vermelha, bem como a adição da polpa de pitaia como complemento nutricional à formulação.

A composição centesimal das farinhas de leguminosas (Grão-de-bico, Lentilha, Ervilha e Feijão) e da polpa da pitaia foi realizada com base nos métodos AOAC previamente implementados. Foram quantificados os açúcares solúveis livres (HPLC-RI), ácidos gordos (GC-FID) e tocoferóis (HPLC-Fluorescência). Adicionalmente, as betacianinas presentes no extrato da casca de pitaia foram tentativamente identificadas e quantificadas (HPLC-DAD-ESI/MS). Por fim, os *cupcakes* elaborados com as farinhas de leguminosas, polpa de pitaia, extrato da casca e aquafaba foram avaliados quanto às suas propriedades físicas (cor e textura), e à sua composição centesimal, química e microbiológica ao longo do tempo de armazenamento de 6 dias.

As farinhas analisadas revelaram teores semelhantes de hidratos de carbono e proteínas. Em contrapartida, a polpa da pitaia apresentou um conteúdo mais elevado de hidratos de carbono, açúcares solúveis livres e proteínas. Relativamente ao perfil de ácidos gordos, tanto as farinhas como a polpa da pitaia eram predominantemente

compostas por ácidos gordos polinsaturados. no que respeita aos açúcares solúveis livres, as farinhas de leguminosas continham apenas sacarose, enquanto a polpa da pitaia era composta por frutose, glucose e trealose. Foram identificadas duas isoformas de tocoferóis na polpa da pitaia, predominando o  $\alpha$ -tocoferol, e três isoformas nas farinhas de leguminosas, com  $\gamma$ -tocoferol como o mais abundante. Além disso, foram detetadas cinco betacianinas no extrato recuperado a partir da caca da pitaia: betanina, isobetanina, filocactina, 4'-O-malonil-betanina e isofilocactina, com um conteúdo máximo de betacianinas de  $43,4 \pm 0,8$  mg/g de extrato.

As formulações dos *cupcakes* produzidas com as farinhas de leguminosas ao longo de 6 dias de armazenamento apresentaram teores mais elevados de proteínas, lípidos, cinzas e açúcares solúveis livres em comparação com os *cupcakes* controlo, que continham farinha de trigo. O perfil de ácidos gordos das formulações era maioritariamente composto por ácido palmítico (C16:0), oleico (C18:1n9c) e linoleico (C18:2n6c). Adicionalmente, os *cupcakes* que continham polpa e extrato da casca de pitaia exibiram uma tonalidade avermelhada, observando-se uma perda de intensidade da cor na parte externa ao longo do tempo, enquanto a parte interna apresentou um aumento de coloração. A dureza dos *cupcakes* aumentou ao longo do tempo de armazenamento, sendo que os *cupcakes* com farinhas de leguminosas exibiram maior dureza do que aqueles com farinha de trigo, fenómeno comum em produtos sem glúten. Após a cozedura, todos os *cupcakes* apresentaram níveis aceitáveis de crescimento microbiano.

**Palavras-chave:** Intolerância alimentar; betacianina; sem glúten; farinha de leguminosas; novos produtos.

## ABSTRACT

In recent years, the use of food ingredients and additives has become a growing concern in the food industry in response to the specific dietary demands of consumers, especially those who deal with conditions such as celiac disease, food intolerances and allergies daily. Therefore, there has been a growing trend in the development of new alternative food products, using raw materials previously considered irrelevant or undervalued. Among them, legume flour has gained prominence, providing the confectionery and bakery industry with gluten-free alternatives, rich in nutrients and with low glycemic content, for application in the most diverse products. Associated with these flours, natural dyes from fruits such as dragon fruit have also been widely explored, becoming safe options for those seeking to avoid the potential adverse effects caused by artificial dyes. In this sense, this work aimed to create a cupcake free of gluten and allergens derived from milk and eggs, from legume flour, using aquafaba and natural coloring extracted from the skin of the red dragon fruit, as well as the addition of pulp. pitaya as a nutritional complement to the formulation.

The proximate composition of legume flours (Chickpeas, Lentils, Peas and Beans) and dragon fruit pulp was carried out based on previously implemented AOAC methods. Free soluble sugars (HPLC-RI), fatty acids (GC-FID) and tocopherols (HPLC-Fluorescence) were quantified. Additionally, the betacyanins present in the dragon fruit peel extract were tentatively identified and quantified (HPLC-DAD-ESI/MS). Finally, the cupcakes made with legume flour, dragon fruit pulp, peel extract and aquafaba were evaluated for their physical properties (color and texture), and their proximate, chemical and microbiological composition over the storage time of 6 days.

The flours analyzed revealed similar levels of carbohydrates and proteins. On the other hand, the pitaya pulp had a higher content of carbohydrates, free soluble sugars and proteins. Regarding the fatty acid profile, both the flours and the dragon fruit pulp were predominantly composed of polyunsaturated fatty acids. Regarding free soluble sugars, legume flours contained only sucrose, while dragon fruit pulp was composed of fructose, glucose and trehalose. Two tocopherol isoforms were identified in dragon fruit pulp, with  $\alpha$ -tocopherol predominating, and three isoforms in legume flour, with  $\gamma$ -tocopherol as the

most abundant. Furthermore, five betacyanins were detected in the extract recovered from pitaya caca: betanin, isobetanin, phyllocactin, 4'-O-malonyl-betanin and isophyllocactin, with a maximum betacyanin content of  $43.4 \pm 0.8$  mg/ g of extract.

Cupcake formulations produced with legume flour over 6 days of storage showed higher levels of proteins, lipids, ash and free soluble sugars compared to control cupcakes, which contained wheat flour. The fatty acid profile of the formulations was mainly composed of palmitic acid (C16:0), oleic acid (C18:1n9c) and linoleic acid (C18:2n6c). Additionally, the cupcakes that contained dragon fruit pulp and peel extract exhibited a reddish hue, with a loss of color intensity on the outside over time, while the inside showed an increase in color. The hardness of the cupcakes increased over storage time, with cupcakes with legume flours exhibiting greater hardness than those with wheat flour, a common phenomenon in gluten-free products. After baking, all cupcakes showed acceptable levels of microbial growth.

**Keywords:** Food intolerance; betacyanin; gluten-free; legume flour; new products.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>iii</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	<b>xii</b>
<b>ÍNDICE DE EQUAÇÕES</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ÍNDICE DE GRÁFICOS</b> .....	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>xv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>2</b>
1.1. Corantes alimentícios .....	2
1.1.1. Corantes naturais e artificiais.....	3
1.1.2. Betaláínas.....	4
1.1.2.1. Betacianinas e betaxantinas .....	6
1.1.3. Matrizes naturais como fontes alternativas das betacianinas .....	9
1.1.3.1. Origem, morfologia e caracterização nutricional da pitaia.....	10
1.2. Farinhas Alternativas .....	12
1.2.1. Novas farinhas .....	12
1.2.2. Fontes para obtenção de farinhas alternativas .....	13
1.3. Novos Produtos de panificação e pastelaria .....	15
1.3.1. Substituição dos ingredientes tradicionais nos produtos de pastelaria e panificação.....	15
1.4. Objetivos.....	18
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
2.1. Obtenção e preparação das matérias-primas.....	21
2.2. Caracterização centesimal e valor energético .....	22

2.2.1. Análise do teor em lípidos .....	22
2.2.2. Análise do conteúdo inorgânico (cinzas).....	23
2.2.3. Análise de Proteínas .....	24
2.2.4. Hidratos de carbono.....	25
2.2.5. Valor energético.....	26
2.3. Caracterização química.....	26
2.3.1. Análise de Ácidos gordos .....	26
2.3.2. Tocoferóis .....	27
2.3.3. Açúcares solúveis livres .....	28
2.4. Extração e quantificação de betalaínas presentes na casca da pitaia.....	29
2.5. Formulação do <i>cupcake</i> .....	32
2.6. Análises físico-químicas dos diferentes <i>cupcakes</i> .....	33
2.6.1. Avaliação da cor .....	34
2.6.2. Avaliação da textura .....	34
2.7. Análise microbiológica.....	35
2.7.1. Contagem de microrganismos.....	35
2.8. Análise estatística .....	36
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
3.1. Caracterização centesimal das farinhas e polpa da pitaia .....	39
3.1.1. Farinha de leguminosas .....	39
3.1.2 Polpa da pitaia.....	41
3.3. Caracterização química das Farinhas e Polpa de Pitaia.....	43
3.3.1. Açúcares solúveis livres .....	43
3.3.2. Tocoferóis .....	45
3.3.3. Perfil de ácidos gordos .....	47

3.4. Quantificação e identificação de betalainas.....	52
3.5. Caracterização dos <i>cupcakes</i> .....	53
3.5.1. Composição centesimal.....	54
3.5.2. Perfil de açúcares solúveis livres e ácidos gordos.....	55
3.6. Análises físicas dos <i>cupcakes</i> produzidos.....	55
3.6.1. Análise de textura.....	55
3.6.2. Análise de cor.....	57
3.7. Análises microbiológicas.....	60
<b>4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS .....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura química geral das betalaínas.....	5
<b>Figura 2</b> – Estrutura química da betanidina e betanina.....	7
<b>Figura 3</b> - Estrutura química da Indicaxantina .....	8
<b>Figura 4</b> - Variações <i>H. Costaricensis</i> e <i>H. udantus</i> .....	10
<b>Figura 5</b> - Aparelho de Soxhlet.....	22
<b>Figura 6</b> - Cadinhos em exsicador após incineração.....	24
<b>Figura 7</b> - Método de Kjeldahl: <b>(a)</b> Após digestão; <b>(b)</b> Aparelho de Kjeldahl.....	25
<b>Figura 8</b> – Amostras em banho termostaticado .....	28
<b>Figura 9</b> - Equipamento de ultrassom.....	30
<b>Figura 10</b> - Amostras após liofilização .....	30
<b>Figura 11</b> - Equipamento de HPLC-DAD-ESI/MS .....	31
<b>Figura 12</b> - Separação por HPLC de betacianinas de pitaia vermelha <i>H. costaricensis</i> (a atribuição de cada pico é dada pela Tabela 11).....	53
<b>Figura 13</b> - Diferentes formulações de cupcake com seus respectivos códigos; FG: Cupcake com farinha de grão-de-bico; FGPE: Cupcake com farinha de grão-de-bico adicionada de polpa e extrato de pitaia; FF: Cupcake com farinha de feijão; FFPE: Cupcake com farinha de grão-de-bico adicionada de polpa e extrato de pitaia; FT: Cupcake com farinha de trigo (controlo). (Autoria própria, 2024) .....	54

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Formulação padrão do <i>cupcake</i> . .....	33
<b>Tabela 2.</b> Composição centesimal e valor energético das farinhas de leguminosas. ....	40
<b>Tabela 3.</b> Composição centesimal em proteínas, lípidos e cinzas segundo distintos autores da literatura.....	41
<b>Tabela 4.</b> Composição centesimal e valor energético da polpa de Pitaia. ....	42
<b>Tabela 5.</b> Identificação e quantificação dos açúcares solúveis livres nas farinhas de leguminosas por HPLC-IR (g/100g ps) .....	43
<b>Tabela 6.</b> Identificação e quantificação dos açúcares solúveis livres na polpa da pitaia por HPLC-IR (g/100g ps).....	44
<b>Tabela 7.</b> Identificação e quantificação dos tocoferóis nas farinhas de leguminosas utilizando a técnica de HPLC-fluorescência (mg/100g ps).....	46
<b>Tabela 8.</b> Identificação e quantificação dos tocoferóis na polpa da pitaia utilizando a técnica de HPLC-fluorescência (mg/100g ps).....	47
<b>Tabela 9.</b> Identificação e quantificação de ácidos gordos nas farinhas de leguminosas utilizando a técnica de CG-FID (%). .....	49
<b>Tabela 10.</b> Identificação e quantificação de ácidos gordos na polpa da pitaia utilizando a técnica de CG-FID (%). .....	51
<b>Tabela 11.</b> Resposta cromatográfica de betacianinas (tempo de retenção (Rt), comprimentos de onda de absorção máxima na região visível ( $\lambda_{max}$ ) e dados espectrais de massa (MS)) identificadas provisoriamente no extrato da casca de <i>S. costaricensis</i> .	52
<b>Tabela 12.</b> Composição centesimal dos diferentes <i>cupcakes</i> , ao longo do tempo de armazenamento de 6 dias, (secção esquerda); expresso em g/100 g de pf; Açúcares solúveis livres (secção intermédia) g/100 g de ps de ácidos gordos (secção direita), % relativa.....	54
<b>Tabela 13.</b> Diferentes dimensões de Textura dos diferentes <i>cupcakes</i> , ao longo do tempo de armazenamento de 6 dias, (secção esquerda); e as coordenadas Cielab da leitura de cor interna e externa (secção direita). .....	59

## ÍNDICE DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1-</b> Teor total em cinzas expressos em g/100g.....	23
<b>Equação 2-</b> Teor total de proteínas expressos em g/100g. ....	25
<b>Equação 3</b> – Teor de hidratos de carbono expresso em g/100g.....	26
<b>Equação 4</b> – Valor energético expresso em kcal.....	26

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> – Representação gráfica do crescimento microbiano nas diferentes matérias-primas.....	61
<b>Gráfico 2</b> - Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos ao longo de 6 dias.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>a</i> *	Coordenada vermelho/verde
ANOVA	Análise de variância
AOAC	Association of Analytical Communities
<i>a</i> <sub>w</sub>	Atividade de água
<i>b</i> *	Coordenada amarelo/azul
CE	Conformidade europeia
CG-FID	Cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama
CIMO	Centro de Investigação da Montanha
D65	Iluminante padrão (luz natural do dia)
DAD	Detetor de arranjo de díodos
DC	Doença celíaca
DP	Desvio padrão
DRBC	Meio Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol
e.g.	Por exemplo
E162	Vermelho beterraba
E171	Dióxido de titânio
Ed.	Edição
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
ESA	Escola Superior Agrária
ESI	Ionização por electrospray
FAMEs	Padrão de Ésteres metílicos de ácidos gordos
FAO	Organização das nações unidas para a Alimentação e Agricultura
FE	Farinha de ervilha
FF	Farinha de feijão
FFPE	Farinha de feijão adicionada com polpa e extrato de pitaia
FG	Farinha de grão-de-bico
FGPE	Farinha de grão-de-bico adicionada com polpa e extrato de pitaia
FL	Farinha de lentilha
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-DAD-ESI/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de díodos, ionização por electrospray e espectroscopia de massa
HPLC-IR	Cromatografia líquida de alta eficiência com índice de refração

INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
IPB	Instituto Politécnico de Bragança
ISO	Organização Internacional de Normalização
$L^*$	Luminosidade
MS	Espectroscopia de massa
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados
nd	Não detetado
$p$	Probabilidade de significância
PCA	Meio Plate Count Agar
pf	Peso fresco
pH	Potencial hidrogeniónico
PI	Padrão interno
ps	Peso seco
PUFA	Ácidos gordos poliinsaturados
Rt	Tempo de retenção
SFA	Ácidos gordos saturados
sin.	Sinónimo
sp.	Espécie
T	Tempo
TA	Tempo de armazenamento
TBCA	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TF	Tipo de farinha
UE	União Europeia
UFC	Unidades formadoras de colónias
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV-Vis	Espectroscopia ultravioleta visível
VRBLA	Meio Violet Red Bile Lactose Agar
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma
$\delta$	Delta
$\kappa$	Kappa
$\lambda_{\max}$	Comprimento de onda máximo



A decorative border in white lines frames the page. It features ornate floral motifs in the corners and repeating geometric patterns along the top and bottom edges.

# Capítulo 1

## **1. INTRODUÇÃO**

A crescente consciencialização dos consumidores sobre saúde e bem-estar tem impulsionado a procura por produtos alimentares naturais, livres de componentes que possam desencadear alergias ou reações adversas no organismo daqueles que os consomem. Este facto tem incentivado o estudo e o desenvolvimento de novos ingredientes mais seguros, mantendo a qualidade nutricional e sensorial dos produtos finais. Deste modo, as alergias alimentares tornaram-se uma das principais preocupações, devido à crescente utilização de compostos artificiais ou ingredientes em alimentos que podem desencadear respostas imunológicas. Um exemplo são os corantes alimentares artificiais, cujos efeitos adversos têm sido comprovados ao longo dos anos. Igualmente, a presença de proteínas de cereais (*e.g.*, glúten), de leites e derivados (*e.g.*, caseína,  $\alpha$  e  $\beta$ -lactoglobulina), do ovo (*e.g.*, ovoalbumina, ovomucóide e conalbumina), mariscos, entre outros, tem se tornado uma problemática para os consumidores intolerantes e alérgicos a essas proteínas (Muthukumar et al., 2020). Face a este problema, observa-se um aumento no incentivo ao desenvolvimento de alternativas alimentares para satisfazer as necessidades dos consumidores finais.

### **1.1. Corantes alimentícios**

Na indústria alimentar a cor desempenha o papel crucial na aceitação de um produto por parte do consumidor, exercendo ainda, efeito substancial no estímulo do apetite. A adição de corantes e outros aditivos alimentares permite melhorar a aparência, sabor, textura e conservação dos alimentos, ou seja, realçar as características desejáveis, além de disfarçar características indesejáveis. Diante dessa realidade, observa-se um crescente investimento da indústria alimentar na cor e aparência dos produtos, visando aumentar a sua atratividade para os consumidores.

### 1.1.1. Corantes naturais e artificiais

Entre a vasta gama de aditivos alimentares existentes, os corantes destacam-se, desempenhando a função de conferir, potenciar ou restituir a coloração dos produtos alimentares até chegar ao consumidor final. A classificação dos corantes depende de sua origem, sendo divididos em duas principais categorias: os corantes naturais, extraídos de animais, plantas, microrganismos e minerais, e os corantes artificiais, obtidos a partir de síntese química em laboratórios (Honorato et al., 2016; Ribeiro & Veloso, 2021).

Os pigmentos/corantes provenientes de fontes naturais podem ser categorizados com base na estrutura química. Os compostos hidrossolúveis incluem as antocianinas (vermelho, azul e roxo) e betalaínas (vermelho e roxo). Por outro lado, os lipossolúveis englobam os carotenóides (amarelo, laranja e vermelho) e clorofilas (verde). Nas plantas e em algumas espécies de fungos, estes pigmentos, além de serem responsáveis pela coloração, desempenham uma importância biológica para o metabolismo e promovem a polinização das mesmas por animais (Rodríguez-Amaya, 2016; Aguirre-Joya et al., 2020; Lin & Xu, 2020).

Na indústria alimentar, os corantes de origem natural são reconhecidos pela sua baixa estabilidade, ou seja, degradam-se facilmente dependendo do tipo de processamento a que são expostos, como por exemplo, tratamentos com altas temperaturas ou meios ácidos (Ghosh et al., 2022). Face a este facto, os corantes artificiais continuam a ser amplamente utilizados devido ao baixo custo de produção, maior estabilidade química e à dificuldade de perda de cor, desempenhando um papel eficaz nas necessidades da indústria, como a grande diversidade de cores. No entanto, nos últimos anos, o uso intensivo de corantes artificiais tem sido objeto de estudos devido à crescente preocupação com os efeitos carcinogénicos, mutagénicos e citotóxicos provocados por este tipo de corantes, o que levou à criação de órgãos avaliadores que possam garantir a segurança do seu consumo (Antunes & Araújo, 2000; Freitas, 2012). Na União Europeia (UE) a regulamentação dos corantes alimentares é realizada pela EFSA (European Food Safety Authority) e pelo Regulamento (CE) n° 1333/2008.

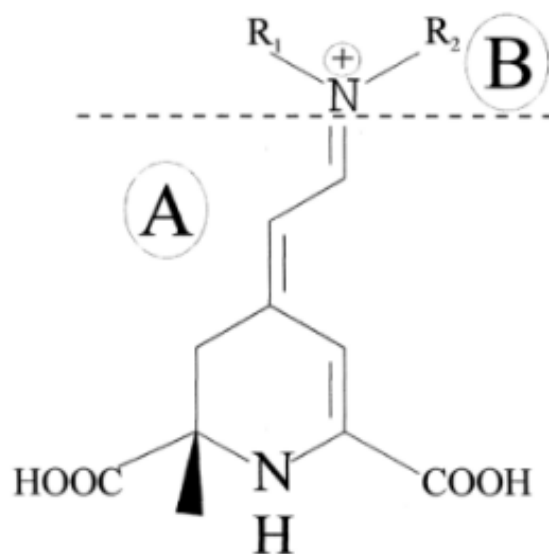
De acordo com o Anexo II do Regulamento (CE) n° 1333/2008, apenas cerca de 40 corantes são permitidos na UE, dos quais 38 podem ser utilizados em alimentos. Anteriormente, o corante E 171 (dióxido de titânio) era autorizado para uso alimentar. No entanto, devido a estudos que indicaram a possibilidade deste corante apresentar genotoxicidade, a EFSA recomendou a sua remoção da lista de corantes autorizados para aplicação em alimentos (EFSA, 2021). Atualmente, o Regulamento (CE) n° 1333/2008 permite o uso do E 171 apenas em medicamentos e cosméticos.

Dessa forma, a preocupação dos consumidores, das indústrias e investigadores com uma alimentação mais saudável e equilibrada tem influenciado significativamente a investigação de novos corantes de origem natural e de técnicas que possam superar os problemas destes compostos face à instabilidade durante o processamento (Luiza Koop et. al, 2022).

Os recentes estudos científicos envolvendo pigmentos naturais têm vindo a ganhar cada vez mais destaque, como por exemplo a exploração de matrizes naturais ricas em composto corantes não tão explorados, as betalaínas. Estes pigmentos são caracterizados como detentores de um alto potencial de corante natural, capazes de substituir até mesmo os corantes artificiais, e até ser uma alternativa viável quando comparados a outros tipos de pigmentos naturais (Thaiudom et al., 2021).

### 1.1.2. Betalaínas

As betalaínas são compostos que pertencem à classe de pigmentos hidrofílicos que contêm azoto, que podem ser encontrados em frutos, flores, raízes e folhas de plantas pertencentes predominantemente à ordem vegetal *Caryophyllales* (e.g., *Amaranthaceae* e *Cactaceae*); e em espécies de fungos dos géneros *Amanita*, *Hygrocybe* e *Hygrophorus*. As betalaínas podem ser classificadas de acordo com a estrutura química geral em duas classes: as betacianinas e as betaxantinas (Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2021; Luiza Koop et. al, 2022).



**Figura 1-** Estrutura química geral das betalainas  
(Delgado-Vargas et al., 2000).

Na biosíntese das betalainas, o aminoácido aromático tirosina é hidroxilado formando o composto 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-dopa). Após a conversão, este transforma-se no ácido betalâmico (4-(2-oxoethylidene)-1,2,3,4-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylic acid). O ácido betalâmico é a unidade estrutural comum tanto para as betacianinas quanto para as betaxantinas (**Figura 1**), onde a identidade dos resíduos R1 e R2 serão responsáveis por determinar se a estrutura representada se tratará de uma betacianina ou betaxantina (Sarker et. al, 2022). Para a formação de betacianinas e betaxantinas, os resíduos R1 e R2 dependerão principalmente da condensação do ácido betalâmico com o cyclo-DOPA (L-3,4-dihydroxy-phenylalanine), derivados de glicosil, aminoácidos e seus derivados (Khan, 2016a).

Por ser um composto natural, a estabilidade e resistência/permanência da pigmentação das betalainas podem sofrer a influência de fatores externos, como a atividade de água, pH, temperatura, oxigênio, exposição à luz ou a presença de iões metálicos. Esta influência pode promover reações químicas como isomerização, desglicosilação, hidrólise, descarboxilação e desidrogenação, resultando na perda ou alterações da cor (Khan, 2016b; Calva-estrada et al., 2022).

Para contornar as limitações destes pigmentos, emergiram promissoras técnicas de encapsulação, utilizando partículas de dimensões micro ou nano, variando conforme as técnicas e parâmetros empregues. Os métodos de encapsulação mais utilizados para as betalaínas são o *Spray drying* e gelatinização iónica (Otálora et al., 2016, 2018). Outro método, já estudado, envolve a combinação de antioxidantes, especialmente com os ácidos ascórbico e isoascórbico, onde o recurso e aplicações destes compostos, demonstrou o aumento na estabilidade das betalaínas frente a tratamentos térmicos de micro-ondas (Khan, 2016b; Calva-estrada et al., 2022).

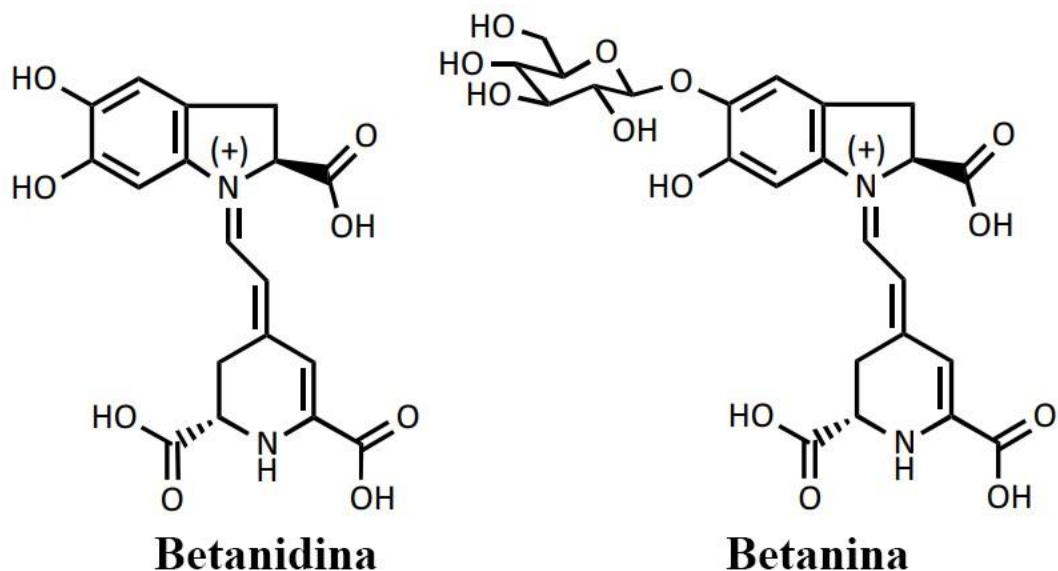
Além da possibilidade de utilização como corantes naturais na indústria alimentar, estudos na área da saúde demonstram também que as betalaínas possuem um enorme potencial na produção de medicamentos antimicrobianos, com a possibilidade de conjugação com antibióticos de amplo espectro (Wijesinghe & Choo, 2022). Para além destas capacidades, estas moléculas podem ser exploradas nas diferentes indústrias, devido às suas propriedades benéficas à saúde humana, como efeitos anti-diabéticos, anti-lipídemicos, anti-inflamatórios e anti-cancerígenos (Abedi-firoozjah et al., 2023).

Em estudos conduzidos por Escribano et. al (2017), Tabio-garcía et. al (2021) e Villa-jaimés et. al (2022) foi-se confirmada positivamente a eficiência da atividade antioxidante de betalaínas provenientes de plantas da família Amaranthaceae e Cactaceae, aumentando a possibilidade destes compostos tornarem-se fontes alternativas de antioxidantes e corantes naturais.

#### 1.1.2.1. Betacianinas e betaxantinas

Pertencente ao grupo das betalaínas, as betacianinas são pigmentos que apresentam uma coloração que varia entre o vermelho e o violeta e que apresentam um espectro máximo de absorção entre os comprimentos de onda de 536-540 nm. As betacianinas, na sua estrutura química geral, sofrem variações no grupo acilo e nas frações de açúcar, alterações essas as quais as caracterizam. Entre as moléculas de betacianinas mais conhecidas, destaca-se a betanidina, que constitui a estrutura básica para a maioria das betacianinas, e a betanina (betanidin 5-O-β-D-glucoside) (**Figura 2**), ambas podem ser

extraídas a partir da raiz da beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L.) (Luiza Koop et. al, 2022; Sarker et. al, 2022; Carmen et al., 2023).



**Figura 2** – Estrutura química da betanidina e betanina  
(Adaptado de Gandía-herrerro & García-carmona, 2013).

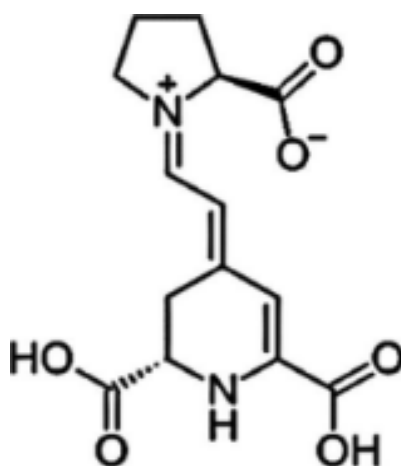
Na biosíntese das betacianinas a condensação do grupo imino cyclo-DOPA com o ácido betalâmico é predominante para a formação da betanidina. A partir desse ponto, as variações consideráveis e os tipos de betacianinas irão diferir entre si pela ocorrência da glicosilação dos grupos hidroxilo da estrutura base da betanidina, localizados nas posições 5 e 6, sendo glicosilados de forma sucessiva formando as betaninas. No entanto, a glicosilação pode acontecer antes da condensação do grupo cyclo-DOPA com o ácido betalâmico, onde as moléculas betanina formadas sofrem acilação, promovendo a formação de 1-*O*-acilglicosídeos (Sarker et. al, 2022; Dong et. al, 2023; Zhang et. al, 2023).

Na família das Betalaínas, além das betacianinas, encontramos as betaxantinas, sendo estes compostos obtidos pela condensação do ácido betalâmico em conjugação com vários tipos de aminas (*e.g.*, glutamina) e aminoácidos (*e.g.*, tyrosina), apresentando coloração amarela com o espectro máximo de absorção no comprimento de onda de 480

nm, independentemente da natureza do aminoácido ou amina presente na sua estrutura (Luiza Koop et. al, 2022; Carmen et al., 2023).

Até o momento foram descobertas aproximadamente 50 tipos de betacianinas e 20 tipos de betaxantinas, onde a disponibilidade das betaxantinas e betacianinas em matrizes vegetais, na sua maioria das vezes, não é encontrada nas mesmas espécies de plantas. No entanto, existem exceções, como no caso do figo-da-índia (*Opuntia ficus-indica* [L.]) e da beterraba vermelha, onde os compostos indicaxantina (**Figura 3**) e betanina, podem ser encontradas e extraídas (Cai et al., 2005; Martins et al., 2024).

A indicaxantina atualmente é uma das betaxantinas mais exploradas em estudos na área da saúde, devido a capacidade desta molécula de agir como agente antioxidante e anti-inflamatório. Além disso, tem-se indicado o potencial da capacidade desta na prevenção de doenças neurológicas e patologias cancerígenas (Tutone et al., 2018; Allegra et al., 2019).



**Figura 3** - Estrutura química da Indicaxantina  
(Tutone et al., 2018).

Relativamente à estabilidade estrutural, na literatura é descrito que as betacianinas tendem a ser mais estáveis quando comparadas com as betaxantinas, tanto a temperatura ambiente quanto durante tratamentos térmicos, favorecendo de certa forma a sua preferência e utilização em produtos alimentares (Martins et al., 2024).

### 1.1.3. Matrizes naturais como fontes alternativas das betacianinas

As famílias botânicas *Amaranthaceae* e *Cactaceae* são as principais fontes de betacianinas. Entre as fontes mais exploradas, merecem destaque as várias variedades de beterraba, fonte natural de onde se recupera o corante natural E 162 (vermelho beterraba) (Cai et al., 2005). No entanto, outras matrizes menos exploradas têm-se tornado alternativas promissoras para a extração destes compostos.

As espécies vegetais aos quais apresentam betacianinas passíveis de extração de pigmentos incluem os grãos de amaranto (*Amaranthus tricolor* L.), a acelga colorida (*Beta vulgaris* L. ssp. *Cicla*), a pitáia vermelha-violeta (*Hylocereus* sp.), as flores da perpétua roxa (*Gomphrena globosa* L.) e *Rivina humilis* L. (Cai et al., 2005; Roriz et al., 2020).

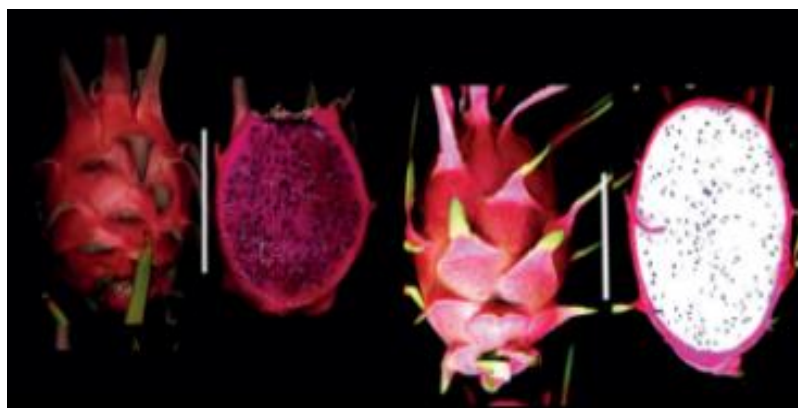
Geralmente as betacianinas aplicadas a alimentos são extraídas por processos de maceração, onde são inicialmente macerados juntamente com o solvente de extração, que pode ser a água, ou então com solventes orgânicos, como o etanol, tendo sempre em conta o rendimento da extração para possibilitar uma diminuição nos gastos de solventes e energia. Além disso, outros métodos como o de extração assistida por ultrassom; microondas; tratamentos enzimáticos; ou microondas associado a tratamentos enzimáticos estão hoje em dia a ser explorados como alternativas capazes de acelerar os processos de extração (Moussa-ayoub, 2011; Roriz et al., 2020, 2021).

Com base nos resultados obtidos por Roriz et al. (2017), a otimização das extrações de betacianinas com recurso a técnicas de extração emergentes, como extração assistida por ultrassom e microondas, encontrados para as flores de perpétua roxa demonstrou-se viável, com redução dos tempos de extração e obtenção de rendimentos satisfatórios, consolidando-a como uma potencial fonte de betacianinas.

Os frutos das espécies de cactos *Opuntia* sp. e *Selenicereus* sp. sin. *Hylocereus* sp. caracterizam-se também por apresentar um amplo e variado espectro de cores (Azeredo, 2009). Assim, a pitáia destaca-se pela sua variedade de tonalidades, no que diz respeito a sua coloração.

No mercado mundial, a pitáia é considerada uma fruta exótica devido à sua aparência e coloração, o que a torna um fruto de alto valor acrescentado, para além de possuir um elevado potencial alimentar e comercial (Nunes et al., 2014).

Diante das diferentes variedades de pitáia, destacam-se a *H. undatus* (casca vermelha e polpa branca) e a *H. costaricensis* (casca vermelha e polpa vermelha-violeta) (**Figura 4**) devido à elevada concentração de betacianinas na sua composição (Arivalagan et al., 2021).



**Figura 4** - Variações *H. Costaricensis* e *H. udantus*.

(Adaptado Santos et al., 2022).

A polpa da pitáia pode ser consumida *in natura* ou até mesmo utilizada por parte da indústria alimentar na confeção de gelados, vinhos, geleias, iogurtes e pães. Enquanto a partir da casca, um subproduto comum resultante de processamento, é possível a extração de enzimas, e dos compostos de forte pigmentação, as betacianinas, ou ainda serem utilizadas no desenvolvimento de embalagens, ou na obtenção de compostos bioativos para aplicação/exploração por parte da indústria farmacêutica e cosmética (Huang et al, 2021; Ferreira et al, 2023).

#### 1.1.3.1. Origem, morfologia e caracterização nutricional da pitáia

A pitáia, pitahaya ou *Dragon Fruit* é a denominação para o fruto pertencente à família botânica Cactaceae, que engloba aproximadamente 1500 espécies e 100 géneros de

plantas, nativas da América, ocorrendo maior variação na América central (Junqueira et al., 2002).

O fruto da pitaia é uma baga de tamanho médio a grande, com formato globular ou subglobular. Quando maduros, estes frutos apresentam coloração externa que pode ser amarela ou vermelha-violeta. Como característica distintiva da casca, é observado a presença de folhas modificadas designadas por brácteas consolidadas, que resultam em um formato que se assemelha a escamas. Em algumas espécies, como a *S. setaceus* (pitaia do cerrado), é possível observar a presença de espinhos. Por ser uma baga, a polpa da pitaia contém sementes escuras comestíveis, ricas em óleos essenciais, e a mesma pode apresentar diferentes colorações que variam desde o branco a vermelho-violeta (Nerd & Mizrahi, 1999; Santos et al., 2022).

A reprodução das frutas pode ocorrer por sementes, estaquia ou enxertia. No entanto, as plantas cultivadas a partir de sementes geralmente levam cerca de 4 a 8 anos para produzir frutos. Recomendando-se, portanto, a propagação da pitaia por estaquia, que envolve o plantio de cladódios (caule achatado) da planta, reduzindo significativamente o tempo de floração e produção de frutos (Santos et al., 2022).

Referente a caracterização nutricional e bioquímica, os resultados obtidos por Arivalagan et al. (2021) demonstraram que as variedades de pitaia de polpa vermelha apresentaram valores elevados de pH, fibras dietéticas, amido, concentração de fenólicos total, incluindo o total de flavonoides e capacidade antioxidante, comparativamente com a variedade de pitaia de polpa branca. Em contrapartida, a acidez titulável e açúcar total foram superiores nos frutos da variedade de pitaia de polpa branca. Além disso, ambas variedades exibiram a presença substancial de minerais essenciais, como potássio, magnésio, cálcio, ferro e cobre, e vitaminas como a vitamina C, K1, D2 e H (biotina).

## 1.2. Farinhas Alternativas

### 1.2.1. Novas farinhas

O pão, massas e bolos geralmente incluem trigo (*Triticum aestivum* L.), o segundo cereal mais cultivado no mundo, ficando apenas atrás do milho (*Zea mays* L.). Estima-se que tenham sido produzidas cerca de 789 milhões de toneladas de trigo no período de 2022-23, de acordo com os dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2023).

No trigo e em outros cereais, como o centeio (*Secale cereale* L.) e a cevada (*Hordeum vulgare* L.), as proteínas hidrofóbicas predominantes são conhecidas como glúten. Originário do trigo, o glúten tem uma relevância tecnológica considerável devido à presença de duas proteínas na sua composição: gliadinas (solúveis) e gluteninas (insolúveis) (Scherf, 2019).

Do ponto de vista industrial, as gliadinas e gluteninas desempenham um papel vital na produção de produtos de pasteleria, panificação e massas. As gluteninas são responsáveis pela coesão e elasticidade, enquanto as gliadinas contribuem para a viscosidade e extensibilidade da massas, influenciando significativamente as características sensoriais e a aceitação destes (Araújo et al., 2010; Scherf, 2019).

Contudo, o desafio significativo para a produção de novos alimentos está relacionado à intolerância ou enteropatia sensível às proteínas (prolaminas) contidas em alguns cereais (gliadina no trigo, hordeína na cevada e secalina no centeio), conhecida como doença celíaca (DC). Nessa condição, os indivíduos portadores do antígeno leucocitário humano de classe II específico (haplótipo HLA DQ2 e/ou DQ8) apresentam a dificuldade de digestão dessas proteínas. Isso desencadeia processos inflamatórios que resultam na atrofia parcial ou total da mucosa do intestino delgado, comprometendo a absorção de nutrientes e, por conseguinte, predispondo e induzindo ao surgimento de doenças associadas (Silva & Furlanetto, 2010; Malamisura et. al, 2019). Além da DC, outro desafio relevante é a alergia ao glúten. Neste caso, os indivíduos não celíacos sensíveis manifestam respostas autoimunes ou inatas ao consumir proteínas provenientes de cereais (Scherf, 2019).

Na UE, existem dois regulamentos em vigor que estabelecem as informações e diretrizes sobre a rotulagem de alimentos contendo substâncias ou produtos que possam provocar alergias ou intolerâncias. Sendo estes o Regulamento (UE) n° 1169/2011, de 25 de Outubro de 2011 e o Regulamento de execução (UE) n° 828/2014, de 30 de Julho de 2014.

Neste contexto, a procura de farinhas alternativas para evitar o consumo de farinhas à base de trigo tem aumentado, principalmente devido à demanda por produtos alimentares que possam atender às restrições dietéticas causadas pela DC e alergias alimentares.

### 1.2.2. Fontes para obtenção de farinhas alternativas

Os desafios tecnológicos mais significativos relacionam-se à produção de produtos sem glúten que mantenham características físicas e sensoriais semelhantes aos produtos tradicionais que contêm glúten. A ausência das redes proteicas formadas pelo glúten desempenha um papel crucial na textura e estrutura de pães, bolos e massas (Araújo et al., 2010).

Nas formulações de produtos sem glúten, geralmente são utilizadas matérias-primas à base de amido, como o milho, batata (*Solanum tuberosum* L.), tapioca (*Manihot esculenta* Crantz) e arroz (*Oryza sativa* L.). No entanto, é crucial observar que essas matérias-primas apresentam teor reduzido de proteínas, concentração elevada de gorduras, açúcares redutores e hidratos de carbono. Além disso, possuem alto índice glicémico, associado diretamente à obesidade e diabetes (Gbenga-fabusiwa et al., 2019).

Diante da relação entre a carga glicémica elevada e condições de saúde como obesidade e diabetes, surge a necessidade de produtos sem glúten com carga glicémica mais moderada. Essa preocupação é agravada pela correlação estabelecida entre a DC e o diabetes tipo I. Assim, em estudos recentes, tem havido um desenvolvimento crescente de novas farinhas a partir de cereais, grãos integrais, pseudo-cereais (*e.g.*, quinoa), tubérculos, féculas (*e.g.*, mandioca) e leguminosas com a intenção de elevar o conteúdo de proteínas, fibras e hidratos de carbono de fácil digestão dos produtos sem glúten (Scherf, 2019; Njapndounke et al., 2023).

A fécula de mandioca tem sido utilizada juntamente com farinhas mistas de leguminosas ou outros cereais, devido à presença de amilose, fração viscosa e solúvel capaz de formar géis, e maior grau de presença da fração de amilopectinas presentes no amido. As proporções de amiloses e amilopectinas na mesma matriz influenciam a viscosidade e o poder de geleificação do amido, promovendo características funcionais e sensoriais, como um maior módulo de elasticidade e taxa de expansão (Damodaran et al., 2010; Yu et al., 2023).

No estudo conduzido por Dankwa et al. (2021), os investigadores utilizaram farinhas compostas de fécula de mandioca e feijão-caupi, na proporção de 70:30, na elaboração de pães achatados. Os resultados revelaram que os pães obtidos apresentaram semelhanças notáveis com aqueles feitos com farinha de trigo. Essa similaridade, em grande parte, foi atribuída à funcionalidade da fécula de mandioca, que desempenhou um papel fundamental ao conferir uma textura “emborrachada” e mastigável aos pães.

A farinha de arroz apesar de ser originária de um cereal, não contém glúten, sendo capaz de substituir a farinha de trigo geralmente em pães e bolos. Comumente, esses produtos são feitos com arroz glutinoso, já que este apresenta maior teor de amilose devido a moagem húmida aplicada durante o processamento (Yu et al., 2023).

A quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) é um pseudo-cereal pertencente a família botânica Chenopodiaceae, conhecido pelo seu interessante perfil nutricional, pois apresenta alto teor de fibras, ácidos gordos e proteínas. A presença de fibras em massas influencia a resistência ao escoamento pelo emaranhamento de fibras, aumentando a tensão de escoamento, bem como a viscosidade aparente. Portanto, a farinha de quinoa é capaz de melhorar as características tecnológicas dos produtos, podendo compensar a perda do glúten em produtos livres de glúten (Turkut et al., 2016).

Diante das opções disponíveis, as leguminosas, grãos pertencentes às famílias Fabaceae, também demonstraram ser uma ótima alternativa para o desenvolvimento de farinhas livres de glúten com alto teor de minerais, nutrientes e proteínas. Entre as leguminosas mais conhecidas temos o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), a ervilha (*Pisum sativum* L.), a lentilha (*Lens culinaris* spp. *Culinaris*) e o grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) (FAO, 2016).

Ammar et al. (2022) otimizou a substituição da farinha de trigo por farinhas compostas por arroz, grão-de-bico e alfarroba (*Ceratonia siliqua* L.). Os resultados determinaram a capacidade das farinhas compostas de produzir pães apresentando propriedades aceitáveis de cozimento.

Além da aplicabilidade em produtos de panificação, foi indicado por Ferawati et al. (2021) a possibilidade de aplicação da farinha de leguminosas, como matéria-prima na produção de análogos de queijo à base de plantas, promovendo a elevação do teor de fibras dos análogos de queijo.

A exploração de farinhas alternativas não apenas soluciona os problemas referentes à DC e à alergia ao glúten, mas também possibilita a substituição de ingredientes tradicionalmente utilizados na pastelaria e panificação. Isto significa que ingredientes como ovos, açúcares refinados e gorduras saturadas podem ser reconsiderados à medida que novas farinhas começam a surgir no mercado.

### **1.3. Novos Produtos de panificação e pastelaria**

Os produtos de panificação e pastelaria, como bolos, tartes e *cupcakes*, tipicamente envolvem a combinação de açúcares, gorduras, fermentos, sais, ovos, leites e farinhas. No entanto, além da farinha de trigo, as alergias e intolerâncias alimentares podem surgir devido à presença de proteínas do leite e ovo na formulação desses produtos. Diante disso, é necessária a busca por substitutos a fim de solucionar questões relacionadas a estes efeitos.

1.3.1. Substituição dos ingredientes tradicionais nos produtos de pastelaria e panificação.

Na panificação e pastelaria, o leite desempenha a função de contribuir para a formação do glúten, devido à elevada percentagem de água na sua composição. Além disso, o leite é um componente que influencia a textura, sabor, cor da crosta, conservação e valor nutricional dos produtos assados (Gisslen, 2015). No entanto, a utilização do leite na

pastelaria e panificação é acompanhada das adversidades causadas por alergias e intolerâncias associadas às proteínas e enzimas específicas do leite.

As principais causas de alergias relacionadas ao leite estão associadas à presença de proteínas específicas, sendo quatro delas pertencentes à fração de caseína ( $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseína) e duas à fração do soro de leite ( $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina) (Vandenplas et al., 2024). Uma consideração adicional relacionada ao consumo de leite é a intolerância à lactose, o principal hidrato de carbono presente no leite. Nessa condição, os indivíduos possuem deficiência ou não produzem a enzima lactase, cuja função é decompor a lactose em glicose e galactose, substâncias essenciais que são posteriormente absorvidas pelo organismo (Szilagyi & Ishayek, 2018).

Ademais, os ovos também desempenham outras funções importantes, possibilitando a estruturação, a formação de emulsões que contribuem para o volume e expansão, crescimento, humidificação, adição de sabor e cor, e melhora do valor nutricional das massas (Gisslen, 2015). Porém, assim como no caso do leite, as proteínas presentes nos ovos (ovomucóide, ovoalbumina, ovotransferrina e lisozima), também são responsáveis por desencadear reações alérgicas.

Neste contexto, a exploração de novas alternativas na panificação demonstrou a viabilidade das leguminosas como uma excelente opção para substituição de alguns destes ingredientes. Além de serem reconhecidas como um notável recurso alimentar, devido à sua riqueza em hidratos de carbono, proteínas, fibras alimentares, micronutrientes e vitaminas (He et al., 2021).

As leguminosas destacam-se devido a possibilidade de produção de bebidas vegetais, como no caso da bebida vegetal de soja ao qual este pode substituir integralmente o leite de vaca. Além disso, também é possível a utilização da água residual de seu cozimento, conhecida como aquafaba.

Originário do latim, aquafaba é a concatenação de duas palavras em latim: *aqua* para água e *faba* para grão, sendo definida como água residual de cozimento do grão-de-bico ou outras leguminosas (He et al., 2021). A aquafaba tem ganho espaço na culinária vegan devido a capacidade de formar emulsões e agir como agente espumante e gelatinizante, substituindo eficientemente o ovo na elaboração de maioneses e merengues (Lafarga et al., 2019).

Portanto, diante das problemáticas envolvidas na utilização dos produtos de panificação e pastelaria, é possível estimar a substituição dos ingredientes tradicionalmente utilizados, por ingredientes alternativos, tais como, aquafaba, farinha de leguminosas e corantes naturais extraídos de plantas, ampliando não apenas a diversidade e qualidade dos novos produtos, mas também explorando novos ingredientes, indo de encontro às novas tendências do mercado.

#### 1.4. Objetivos

Este trabalho tem como principal objetivo a elaboração de um produto de pastelaria, *cupcake*, recorrendo a ingredientes alternativos (farinhas de leguminosas, e o recurso da aquafaba), assim como utilização da polpa e de pigmentos da casca da pitaia vermelha-violeta, de forma a tornar este produto isento de glúten e alérgenos derivados do leite e ovos.

Os objetivos específicos deste trabalho são:

1. Estudo do valor nutricional e comportamento reológico de farinhas de leguminosas, mais concretamente feijão, ervilha, lentilha e grão-de-bico;
2. Aplicar metodologia previamente otimizada para extração de pigmentos da casca da pitaia;
3. Desenvolver formulação de *cupcake* com adição de farinha de leguminosas, aquafaba e a polpa da pitaia, evitando a presença de glúten e alérgenos;
4. Aplicar os pigmentos extraídos da casca da pitaia na formulação do *topping* decorativo do *cupcake*;
5. Caracterizar: i) Composição físico-química da polpa da pitaia; ii) Avaliar compostos presentes no extrato obtido a partir da casca; iii) Propriedades físico-químicas do produto final *cupcake* ao longo do tempo de prateleira de 6 dias;
6. Análise microbiológica: i) Mesófilos aeróbios totais, coliformes, bolores e leveduras nas farinhas de leguminosas e polpa da pitaia; ii) Mesófilos aeróbios totais, bolores e leveduras no extrato e no produto final *cupcake*.





# Capítulo 2



## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Obtenção e preparação das matérias-primas

Para a realização deste estudo, foram obtidos cerca de 7 kg de frutos de pitaiia de casca e polpa vermelha (*Hylocereus costaricensis*), provenientes de um produtor rural do município de Itaipulândia, Paraná, Brasil. Os frutos foram colhidos em meados de julho de 2023 e selecionados com base no tamanho, variando entre médio e grande porte, sem apresentar quaisquer danos visíveis na casca, provocados por pragas ou doenças.

Após a seleção, os frutos foram transportados à temperatura ambiente até ao laboratório de Panificação da Universidade Tecnológica Federal do Paraná UTFPR – Campus Medianeira, Paraná, Brasil. Após o processo de higienização dos frutos, estes foram fatiados separando-se a casca da polpa, dispostos em tabuleiros e congelados em um frigorífico convencional.

Subsequentemente, as cascas e polpa congeladas foram submetidas ao processo de liofilização durante 72 h. Uma vez concluído o processo de liofilização, as amostras foram trituradas em moedor de facas (Solab®, Piracicaba, São Paulo, Brasil), e em seguida, acondicionadas em sacos tipo zip, sendo mantidas em refrigeração até o seu transporte para o laboratório da Escola Superior Agrária (ESA), Bragança, Portugal.

As farinhas de grão-de-bico, feijão, ervilha e lentilha foram cedidas por membro do projeto TRANSCOLAB PLUS - Laboratório Colaborativo Transfronteiriço para a transição verde do setor Agroalimentar e Agroindustrial em conjunto com a empresa Molendum ingredients.

Os demais ingredientes para a preparação dos *cupcakes* foram adquiridos em mercearias da cidade de Bragança, Portugal. Os reagentes e equipamentos utilizados durante as análises foram cedidos pelo Centro de Investigação de Montanha (CIMO) do Instituto Politécnico de Bragança (IPB).

## 2.2. Caracterização centesimal e valor energético

A composição centesimal (hidratos de carbono, cinzas, proteínas e lípidos) e o valor energético das farinhas de leguminosas, polpa de pitaia e *cupcakes* foram avaliados de acordo com os Métodos Oficiais de Análise, 17<sup>o</sup> Ed. (AOAC, 2016) previamente otimizadas no laboratório do CIMO. As amostras foram analisadas em triplicado e expressas nas suas correspondentes unidades.

### 2.2.1. Análise do teor em lípidos

Para a determinação do teor em lípidos, realizou-se a extração utilizando o aparelho de laboratório Soxhlet (**Figura 5**). Uma amostra de 3 g foi colocada nos dedais de extração (com dimensões Ø 26 x 60 mm), e no recipiente de extração (com dimensões Ø 51 x 59 mm) foram adicionados 40 mL de éter de petróleo.



**Figura 5** - Aparelho de Soxhlet  
(Autoria própria, 2024)

O processo desenrolou-se em três etapas: na fase de ebulição, a amostra foi submersa no solvente aquecido, onde o solvente absorveu continuamente os lípidos da amostra, tanto por imersão como por refluxo. Na fase de lavagem, a amostra foi removida do contacto direto com o solvente condensado, sendo que, nesta fase, o único método de

extração contínua da gordura foi através do refluxo. A fase final, de recuperação, consistiu na recolha do solvente para reutilização futura, enquanto a gordura extraída se depositou no fundo do recipiente de extração. Após a extração (durante 1 h), os lípidos foram recolhidos em tubos e deixado a temperatura ambiente, para evaporação do solvente de extração. Os resultados de teores de lípidos foram expressos em g/100 g de peso seco (ps).

Os tubos contendo o teor de lípidos foram acondicionados para posterior utilização, na determinação dos ácidos gordos.

### 2.2.2. Análise do conteúdo inorgânico (cinzas)

A determinação de cinzas foi realizada baseando-se na incineração dos componentes orgânicos da amostra, restando apenas a porção inorgânica (cinzas).

Cerca de 250 mg de amostra foram colocados em cadinhos de porcelana previamente pesados e secos em estufa e arrefecidos em exsiccador, até que estes não apresentem variação do seu peso. Em seguida, os cadinhos foram colocados na mufla e aquecidos a 550°C, durante cerca de 5 h, até a incineração total da matéria orgânica. Após arrefecimento, os cadinhos foram novamente pesados (**Figura 6**). O total de cinzas foi calculada pela **Equação 1**:

$$Cinzas \left( \frac{g}{100 g} \right) = \left( \frac{Pc}{Pa} * 100 \right)$$

**Equação 1-** Teor total em cinzas expressos em g/100 g ps.

Onde:

Pc = Peso das cinzas.

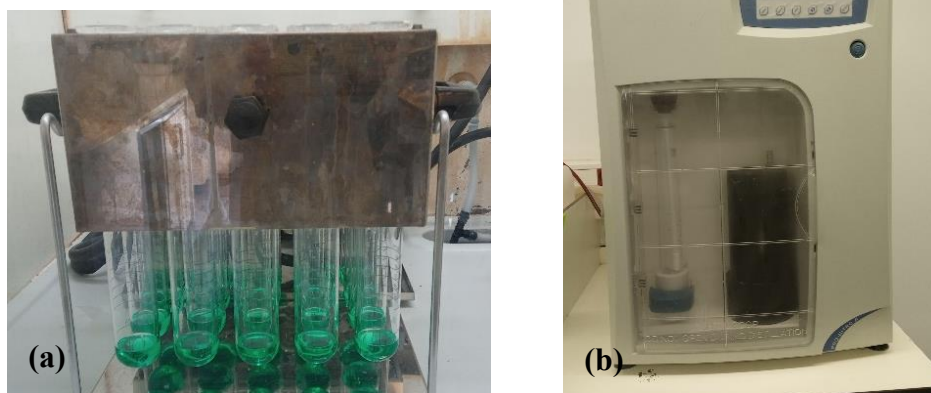
Pa = Peso da amostra.



**Figura 6** - Cadinhos em exsicador após incineração  
(Autoria própria, 2024).

### 2.2.3. Análise de Proteínas

O teor de proteínas das amostras foi determinado de acordo com o método de Macro-Kjeldahl, que consiste na medição do teor de azoto total de um alimento. Na fase de mineralização, 1 g de amostra foram pesados e digeridos por aquecimento com 15 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  97%) para manter o azoto total na forma de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Para acelerar a reação, foi adicionado um catalisador (9% em  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ). Os tubos foram colocados num digestor (Foss™ Digestor) a  $400^\circ\text{C}$  durante aproximadamente 70 min. Após a digestão, as amostras apresentaram tonalidade verde esmeralda característica (**Figura 7a**), e após arrefecimento os tubos foram colocados no aparelho de Kjeldahl (**Figura 7b**), a solução foi tornada alcalina com a adição de NaOH para converter o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em  $\text{NH}_3$ , que foi recolhido por destilação a vapor numa quantidade conhecida de ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ). A reação transferiu o gás amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) para o ião amónio ( $\text{NH}_4^+$ ). A fase de titulação consistiu na adição de NaOH 0,1 N, utilizando vermelho de metilo como indicador para determinar a quantidade de azoto, usando como fator de correção N (quantidade de azoto) x 6,25, e os resultados foram expressos em g/100 g de peso seco (ps).



**Figura 7** - Método de Kjeldahl: (a) Após digestão; (b) Aparelho de Kjeldahl  
(Autoria própria, 2024).

Os teores totais de proteínas presentes nas amostras foram definidos pela **Equação 2**:

$$Proteínas \left( \frac{g}{100 g} \right) = \left( \frac{(N - N_{branco}) * 100}{\frac{m}{1000}} \right) * 6,25$$

**Equação 2**- Teor total de proteínas expressos em g/100 g ps.

Onde:

N = Teor de Azoto (mg).

Nbranco = Teor de azoto do branco (mg).

m = Peso da amostra (g).

#### 2.2.4. Hidratos de carbono

Os teores de hidratos de carbonos nas amostras foram determinados a partir da diferença entre os valores obtidos para o teor em gordura, proteínas e cinzas, de acordo com a seguinte **Equação 3**.

$$\text{Hidratos de carbono} \left( \frac{g}{100 g} \right) = 100 - (g \text{ Cinzas} + g \text{ Proteínas} + g \text{ Gorduras})$$

**Equação 3** – Teor de hidratos de carbono expresso em g/100 g ps.

#### 2.2.5. Valor energético

O valor energético foi calculado conforme o estabelecido pelo Regulamento (UE) n° 1169/2011, sendo expresso em quilocalorias (kcal) (**Equação 4**).

$$\begin{aligned} \text{Valor energético (kcal)} &= 4 * (g \text{ Proteínas} + g \text{ Hidratos de carbono}) \\ &+ 9 * (g \text{ Gorduras}) \end{aligned}$$

**Equação 4** – Valor energético expresso em kcal

### 2.3. Caracterização química

Em conjunto com a caracterização nutricional, foi realizada a caracterização química que incluí as análises de ácidos gordos, tocoferóis e açúcares livres. Os resultados das análises foram expressos em g/100 g de peso seco (ps).

#### 2.3.1. Análise de Ácidos gordos

A porção do teor em gordura total recuperada anteriormente (**Seção 3.2.1.**), passou por um processo de esterificação para facilitar a identificação dos ácidos gordos por Cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama (CG-FID).

Foram adicionados 5 mL de reagente A (metanol/ácido sulfúrico/tolueno na proporção 2:1:1 (v/v/v)) à amostra extraída, e esta foi mantida num banho (Julabo, SW22; Seelbach, Germany) termostaticado a 50 °C, em agitação durante 12 h. Posteriormente, foram adicionados 3 mL de água destilada e 3 mL de éter etílico aos tubos, agitando estes em vórtex por 1 min. Após a separação de fases, a porção sobrenadante dos tubos foi transferida a vials contendo sulfato de sódio anidro, e com o auxílio de filtros de nylon

de 0,2  $\mu\text{m}$ , o conteúdo final foi transferido para vials âmbar de 1,5 mL para a continuação da análise.

O perfil de ácidos gordos foi obtido após injeção em sistema de GC-FID, com um injetor split e com um detetor a 260 °C e uma coluna Macherey Nagel (30 m  $\times$  0,32 mm  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$  df). A temperatura do forno foi programada para uma temperatura inicial da coluna de 100 °C, mantida durante 2 min; seguida pelo aumento da temperatura a 10 °C/min até 140 °C, 3 °C/min até 190 °C, 30 °C/min até 260 °C durante 2 min. O gás de arraste (hidrogénio) foi mantido a 1.1 mL/min (0.61 bar), medidos a 100 °C. A injeção split (1:50) foi realizada a 250 °C.

A identificação dos ácidos gordos individuais foi obtida por comparação dos tempos de retenção com os picos do padrão comercial de 37 FAMES com auxílio do software Clarity 2.4 (DataApex, República Checa) e os resultados foram expressos em percentagem.

### 2.3.2. Tocoferóis

Para a análise de tocoferóis ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -Tocoferol), em 500 mg de amostra foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução BHT (100 mg/mL em hexano) e 400  $\mu\text{L}$  de tocol a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Padrão interno) em tubos de falcon envolvidos com alumínio. Foram ainda adicionados 4 mL de metanol, 4 mL de hexano e 2 mL de solução aquosa concentrada de cloreto de sódio (NaCl), homogenizados em vórtex consecutivamente e individualmente durante 1 minuto. Centrifugou-se a mistura por 5 min e 10 °C, onde o sobrenadante foi transferido a um falcon de 25 mL envolto em papel de alumínio contendo sulfato de sódio anidro.

O extrato foi evaporado sob uma corrente de azoto e posteriormente dissolvida em 2 mL de hexano, filtrado para vials de HPLC.

A quantificação de tocoferóis foi realizada por Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de fluorescência (HPLC-Fluorescência). Os resultados obtidos foram expressos em mg/100 g ps (peso seco).

### 2.3.3. Açúcares solúveis livres

Para determinação do teor em açúcares solúveis livres das amostras, pesou-se cerca de 1 g de amostra seca remanescente, dos cartuchos de extração de Soxhlet (**Seção 3.2.1.**). Adicionou-se 1 mL de solução padrão interno de Melezitose (PI, 25 mg/mL) e 40 mL de solução aquosa de etanol 80:20 (v/v). As amostras foram colocadas em um banho termostaticado por 1 h 30 min a 80 °C (**Figura 8**), sendo agitadas manualmente a cada 15 min.



**Figura 8** – Amostras em banho termostaticado  
(Autoria própria, 2024).

Seguidamente, as amostras foram centrifugadas e filtradas, para posterior processo de evaporação do etanol com recurso a um evaporador rotativo (Büchi, R-210, Flawil, Switzerland). A fase aquosa sobrenadante obtida através de três lavagens sucessivas com éter etílico foi novamente evaporada, onde perpez-se o volume de 5 mL com água destilada num balão volumétrico. Por fim as amostras foram filtradas em filtros de nylon de 0,2 µm para vials âmbar de 1,5 mL.

A análise dos açúcares solúveis livres foi efetuada por Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de índice de refração (HPLC-IR) (Knauer, Smartline System 1000, Berlin, Germany) empregando 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) a 35 °C com um caudal de 1 mL/min.

A identificação e quantificação foi realizada por comparação dos tempos de retenção de padrões comerciais. A análise dos dados obtidos foi realizada com auxílio do software Clarity 2.4 (DataApex, Praga, República Tcheca), e os resultados expressos em g/100 g de peso seco (ps)

#### **2.4. Extração e quantificação de betalainas presentes na casca da pitaia**

Para a extração das betalainas presentes na casca da pitaia foi-se aplicado o método de extração assistida por ultrassom de acordo com o trabalho de Roriz et al. (2022). Pesou-se 10 g de amostra, adicionou-se o solvente de extração H<sub>2</sub>O:EtOH (90:10, (v/v)) numa proporção sólido/líquido de 5 g/L.

O equipamento de ultrassom (UIP1500hdT Hielscher, Alemanha) foi mantido a na potência de 287 W por 38 min (**Figura 9**). As amostras foram filtradas e posteriormente evaporadas a 40 °C utilizando um evaporador rotativo a vácuo a fim de remover o EtOH excedente, para recuperação da porção aquosa.

Finalmente, a fração aquosa foi liofilizada (**Figura 10**) e o extrato em pó pesado, a fim de se obter o rendimento da extração em percentagem.



**Figura 9** - Equipamento de ultrassom  
(Autoria própria, 2024).



**Figura 10** - Amostras após liofilização  
(Autoria própria, 2024).

A identificação e quantificação das betalaínas presentes no extrato da casca foram realizadas por Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de diodos, ionização por electrospray e espectrometria de massas (HPLC-DAD-ESI/MS) (**Figura 11**) com base na metodologia e nas condições cromatográficas previamente aplicadas por Roriz et al. (2018) e (2022). O equipamento utilizado para esta análise foi um sistema Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA), acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) e um compartimento de coluna termostaticada a 35 °C (Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18, 3 µm, 4,6 mm × 150 mm, -Waters, Milford, MA, EUA–coluna).

Simultaneamente, o HPLC-DAD foi acoplado em linha a um espectrómetro de massa (MA) Linear Ion Trap LTQ XL, equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) (Thermo Finnigan, San Jose, CA, EUA).



**Figura 11** - Equipamento de HPLC-DAD-ESI/MS  
(Autoria própria, 2024).

A análise por HPLC-DAD-ESI/MS iniciou-se com a injeção da amostra no sistema de HPLC. Neste processo, os compostos são separados na coluna com base nas suas interações com a fase móvel e a fase estacionária. Para maximizar a deteção das betalaínas, foi acoplado a um sistema com um DAD, responsável pela separação dos compostos no espectro de luz UV-Vis (Faridah et al., 2015). Os comprimentos de onda

ideais para a quantificação das betalaínas foram  $\lambda = 280 \text{ nm}$ ,  $330 \text{ nm}$ ,  $370 \text{ nm}$  e  $520 \text{ nm}$ . Após a separação dos compostos por HPLC-DAD, procedeu-se à ionização dos mesmos por ESI, seguida da análise no MS. Na ionização por eletrospray, gera-se um spray de gotículas carregadas eletricamente através da aplicação de alta tensão ao capilar. Um gás nebulizador, como o azoto, é utilizado para otimizar o fluxo da amostra. Com a evaporação progressiva do solvente, o tamanho das gotículas diminui e a densidade de carga na sua superfície aumenta. Quando essa densidade atinge um ponto crítico, os iões são ejetados para a fase gasosa. Esses iões são, posteriormente, analisados no MS, onde são separados e detetados com base na sua razão massa/carga ( $m/z$ ), permitindo a determinação precisa da massa molecular dos compostos (Ho et al., 2003).

## 2.5. Formulação do *cupcake*

A formulação padrão do *cupcake* foi adaptada com base nas proporções de ingredientes descritas nos estudos de Hedayati e Tehrani (2018) e Nguyen et al. (2020), conforme apresentado na **Tabela 1**. Estas adaptações resultam de modificações parciais nos ingredientes, tendo sido realizados testes culinários até se obter uma formulação adequada para a continuidade do trabalho.

O leite e ovos foram substituídos por aquafaba obtida de ervilhas enlatadas, enquanto a farinha de trigo foi substituída por farinhas integrais de grão-de-bico, feijão, ervilha e lentilha, sendo cada tipo de farinha reservado para um sabor específico de *cupcake*. A polpa da pitáia foi incorporada à formulação, de modo a conferir cor e nutrientes à massa, em conjunto com o extrato pigmentado, obtido a partir da casca de pitáia, que ajudou na fixação da coloração.

**Tabela 1.** Formulação padrão do *cupcake*.

Ingredientes	g/100g
Farinha de leguminosas	25,00
Açúcar	18,00
Aquafaba	40,00
Óleo de girassol	8,00
Fermento químico	4,00
Polpa de pitaia	5,00

Inicialmente, a aquafaba foi separada das ervilhas enlatadas através de um coador de malha fina. Após a pesagem dos ingredientes, a aquafaba foi emulsionada com o açúcar, com adição de algumas gotas de limão para facilitar o processo de emulsificação, de acordo com o descrito por Lafarga et al. (2019). Os restantes ingredientes foram então incorporados na massa, seguida da adição do óleo de girassol, polpa de pitaia, farinhas de leguminosas e fermento.

Após homogeneização, aproximadamente 8 g de massa foram distribuídas de forma uniforme em formas convencionais de *cupcake*, com dimensões de 5 cm de diâmetro por 3,2 cm de altura, e levadas ao forno de convecção a 150°C durante 15 min.

Foram produzidas 15 unidades de *cupcakes* para cada formulação, sendo estas distribuídas em sacos tipo zip, previamente identificados com os tempos de armazenamento. A partir do arrefecimento das amostras, procederam-se às análises centesimais, físicas, químicas e microbiológicas.

## **2.6. Análises físico-químicas dos diferentes *cupcakes***

Todas as análises físico-químicas foram realizadas em triplicado, durante três períodos distintos de armazenamento, nomeadamente após o cozimento ( $T_0 = 0$  dias) e em dois momentos subsequentes ( $T_1 = 3$  dias e  $T_2 = 6$  dias).

### 2.6.1. Avaliação da cor

A cor do *cupcake* foi avaliada utilizando um colorímetro portátil CR400 da Konica Minolta (Chiyoda, Tokyo, Japan) com iluminante D<sub>65</sub>. Os parâmetros de medição considerados foram  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , onde  $L^*$  representa a luminosidade e  $a^*$  e  $b^*$  correspondem ao espaço de cores, variando do vermelho-verde e amarelo-azul, respetivamente. Todos os parâmetros das amostras foram determinados a partir da análise das porções externa e interna dos *cupcakes*.

### 2.6.2. Avaliação da textura

A textura dos *cupcakes* foi analisada com o auxílio de um texturometro TA.XT Plus Texture Analyser da *Stable Micro Systems* (Vienna Court, Godalming, UK). De forma a compreender os efeitos dos diferentes ingredientes na textura dos *cupcakes*, as amostras foram submetidas a um teste de dupla compressão, simulando o processo de mastigação humana. Utilizou-se um cilindro de aço inoxidável com 35 mm de diâmetro, e as amostras foram analisadas numa célula de carga de 5 kg.

Uma vez que os *cupcakes* são produtos sólidos, foi aplicada, como mencionado anteriormente, uma análise de compressão dupla, o que permitiu avaliar diversos parâmetros de textura, tais como, firmeza, adesividade, resiliência, coesão, elasticidade, gomosidade e mastigabilidade. A compressão inicial foi realizada a uma velocidade inicial de 5 mm/s, com a velocidade de teste de 3 mm/s e uma velocidade de retorno de 10 mm/s, assegurando uma análise precisa do comportamento mecânico dos *cupcakes* durante o teste.

O gatilho de análise foi definido como a força, com um limiar de 5 g, e o deslocamento foi programado para uma distância de 10 mm. Este método permitiu caracterizar de forma eficaz as propriedades de textura dos *cupcakes*, destacando as diferenças nos perfis de textura entre as diferentes formulações testadas.

## 2.7. Análise microbiológica

As análises microbiológicas para contagem de microorganismos mesófilos aeróbios totais, coliformes, bolores e leveduras seguiram os procedimentos descritos pela Organização Internacional de Normalização (ISO, 2003). Foram analisadas as farinhas de leguminosas, a polpa de pitaia, o extrato rico em betacianinas e os *cupcakes*, sendo todos acondicionados à temperatura ambiente.

Para preparação das amostras, em triplicado, foram pesados 1 g de cada componente ou *cupcake* que foi misturado com 9 mL de água peptonada estéril. A partir das suspensões iniciais, foram realizadas diluições sucessivas ( $10^{-2}$  a  $10^{-3}$ ), de acordo com as normas ISO, para posterior análise microbiológica.

O crescimento microbiológico dos *cupcakes* foi avaliado ao longo do período de prateleira, com análises realizadas aos 0, 3 e 6 dias.

### 2.7.1. Contagem de microrganismos

A contagem de microrganismos mesófilos aeróbios totais foi realizada utilizando a técnica de sementeira por incorporação, seguindo a norma ISO 4833-2:2013. Para cada amostra, 1 mL foi colocado numa placa de Petri, a qual foram adicionados aproximadamente 15 mL de meio de cultura Plate Count Agar (PCA) líquido. As placas foram preparadas em duplicado. Após homogeneização e solidificação do meio, as placas foram incubadas a 30 °C, em posição invertida, durante 72 h. A contagem foi realizada em placas que continham entre 15 e 300 colônias.

Para a contagem de coliformes, seguiu-se a norma ISO 4832:2006, utilizando também a técnica de sementeira por incorporação. Para isso, 1 mL da amostra, em duplicado, foi inoculada em placas de petri, à qual se adicionaram 15 mL de meio de cultura Violet Red Bile Lactose Agar (VRBLA) líquido. As placas foram homogeneizadas e incubadas a 37 °C durante 48 h, em posição invertida. A contagem foi realizada em placas com entre 10 e 150 colônias.

Para contagem de bolores e leveduras, utilizou-se como referência a norma ISO 21527-1/2:2008. Para tal, foram colocados 0,2 mL da amostra em placas de Petri que continham 15 mL de meio de cultura Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) solidificado.

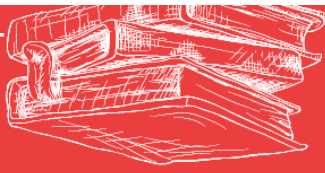
A técnica de sementeira por espalhamento foi a técnica aplicada, em duplicado. As placas foram incubadas a 25 °C durante 5 dias, em posição normal, sendo a contagem de leveduras realizada ao fim de 3 dias e a de bolores ao fim de 5 dias. A contagem foi efetuada em placas com menos de 150 colónias.

## **2.8. Análise estatística**

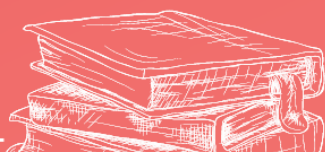
Para a análise dos dados obtidos em triplicado para as amostras das farinhas durante este estudo, os valores foram expressos como média±desvio padrão (DP). As diferenças significativas entre as amostras foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) com um nível de significância de 95 % ( $\alpha = 0,05$ ).

A análise estatística dos *cupcakes* foi conduzida utilizando a ANOVA de dois fatores. A ANOVA de dois fatores foi aplicada para examinar o efeito dos fatores "TA" (tempo de armazenamento) e "TF" (tipo de farinha). Esta abordagem permitiu a avaliação independente dos efeitos de cada fator sobre os parâmetros estudados ao longo do tempo de prateleira.





# Capítulo 3



### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Caracterização centesimal das farinhas e polpa da pitaia

##### 3.1.1. Farinha de leguminosas

Os resultados referentes à composição centesimal e ao perfil energético das farinhas de leguminosas encontram-se apresentados na **Tabela 2**. Observa-se uma baixa variabilidade nos valores energéticos das farinhas analisadas, situando-se os valores entre  $396,1 \pm 0,1$  e  $420 \pm 0,3$  kcal/100 g.

No que respeita à composição centesimal, verificou-se uma relativa uniformidade entre as farinhas analisadas, particularmente no teor de hidratos de carbono e proteínas. Os hidratos de carbono apresentam valores compreendidos entre  $71,27 \pm 0,04$  g/100 g na farinha de lentilha e  $74,76 \pm 0,07$  g/100 g na farinha de ervilha. Os teores de proteínas, variaram entre  $20,04 \pm 0,07$  g/100 g na farinha de grão-de-bico e  $25,43 \pm 0,02$  g/100 g na farinha de lentilha.

É possível observar e destacar que a farinha de grão-de-bico apresentou o maior teor de lípidos, com  $5,44 \pm 0,05$  g/100 g, o que representa aproximadamente três a quatro vezes o valor encontrado nas farinhas de ervilha, lentilha e feijão. Além disso, a presença lípidos saturados ( $0,758 \pm 0,003$  g/100 g) na farinha de grão-de-bico foi aproximadamente de duas a quatro vezes superior ao disposto pelas farinhas estudadas.

O teor de cinzas verificado na farinha de feijão ( $3,10 \pm 0,01$  g/100 g) foi o mais elevado entre as farinhas estudadas, com valores a variar entre  $1,82 \pm 0,01$  g/100 g na farinha de grão-de-bico e  $2,26 \pm 0,01$  g/100 g na farinha de ervilha, sugerindo que as farinhas em análise são relativamente ricas em minerais.

**Tabela 2.** Composição centesimal e valor energético das farinhas de leguminosas.

Composição centesimal (g/100g ps)				
	Farinha de Grão-de-Bico	Farinha de Feijão	Farinha de Ervilha	Farinha de Lentilha
Energia (kcal)	420,0±0,3 <sup>a</sup>	396,1±0,1 <sup>d</sup>	396,5±0,1 <sup>c</sup>	399,7±0,1 <sup>b</sup>
Lípidos	5,44±0,05 <sup>a</sup>	1,70±0,03 <sup>b</sup>	1,10±0,01 <sup>d</sup>	1,43±0,02 <sup>c</sup>
Saturados	0,758±0,003 <sup>a</sup>	0,367±0,003 <sup>c</sup>	0,189±0,003 <sup>d</sup>	0,394±0,001 <sup>b</sup>
Hidratos de carbono	72,71±0,02 <sup>b</sup>	72,35±0,05 <sup>c</sup>	74,76±0,07 <sup>a</sup>	71,27±0,04 <sup>d</sup>
Açúcares	1,06±0,01 <sup>b</sup>	1,10±0,03 <sup>a</sup>	1,08±0,02 <sup>a,b</sup>	0,53±0,01 <sup>c</sup>
Proteína	20,04±0,07 <sup>d</sup>	22,86±0,08 <sup>b</sup>	21,92±0,01 <sup>c</sup>	25,43±0,02 <sup>a</sup>
Cinza	1,82±0,01 <sup>d</sup>	3,10±0,01 <sup>a</sup>	2,26±0,01 <sup>b</sup>	1,86±0,01 <sup>c</sup>

Para cada linha da tabela, as diferenças significativas com  $\alpha=0,05$ ;  $p<0,001$  entre as amostras são representadas por letras diferentes.

A **Tabela 3** resume a composição centesimal de farinhas de lentilha, ervilha, grão-de-bico e feijão branco, agrupando os dados de diferentes autores sobre os teores de proteínas, lípidos e cinzas.

Comparando os resultados deste estudo com os dados reportados por esses autores, verifica-se que as farinhas de lentilha e grão-de-bico exibiram valores similares em termos de teor de lípidos e proteínas. No entanto, observou-se uma maior discrepância no teor de cinzas, sendo os valores reportados na literatura aproximadamente o dobro dos obtidos neste estudo. No caso da farinha de ervilha, o teor de cinzas foi consistente entre este estudo e os autores consultados, enquanto os teores de lípidos e proteínas apresentam maior variabilidade. Relativamente à farinha de feijão, as maiores diferenças encontradas nos dados bibliográficos, referem-se ao teor de proteínas e cinzas, ao passo que o teor de lípidos apresentou pouca variação.

No que se refere as discrepâncias entre os valores de proteínas, lípidos e cinzas das farinhas de leguminosas obtidas neste estudo em comparação com os reportados por outros autores podem ser atribuídas a diversos fatores, como o período de cultivo, as condições climáticas, os fatores ambientais e a disponibilidade de nutrientes no solo (Fabbri & Crosby, 2016).

**Tabela 3.** Composição centesimal em proteínas, lípidos e cinzas segundo distintos autores da literatura.

	Proteína (g/100 g ps)	Lípidos (g/100 g ps)	Cinzas (g/100 g ps)	Referência
Ervilha (CDC Meadow variety)	22,7±0,40	1,36±0,09	2,15±0,03	Cheng et al. (2023)
Lentilha (CDC Richlea variety)	25,1±0,40	0,76±0,02	2,33±0,01	
Lentilha	28,05±0,01	1,14±0,01	3,01±0,08	Du et al. (2014)
Grão-de-Bico	22,37±0,49	6,63±0,03	3,16±0,05	
Feijão branco	25,73±0,48	1,77±0,01	4,10±0,03	
Lentilha	27,64±0,83	1,746±0,043	3,79±0,50	Krause et al. (2022)
Ervilha	18,68±0,56	1,652±0,056	2,67±0,40	
Grão-de-bico	22,19±0,67	6,354±0,018	3,60±0,40	

### 3.1.2 Polpa da pitiaia

A **Tabela 4** compreende a composição centesimal e valor energético da polpa da pitiaia. Entre os constituintes analisados, o teor de hidratos de carbono destacou-se como o mais elevado, representando aproximadamente 88,66±0,04 g/100 g. Os teores de lípidos, cinzas, proteínas e valor energético foram de 3,61±0,04 g/100 g, 5,38±0,01 g/100 g, 6,35±0,02 g/100 g e 396,5±0,2 kcal/100 g, respetivamente.

Segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA, 2024), a composição nutricional da *H. undatus* apresenta teores de hidratos de carbono, proteínas, lípidos e cinzas em peso fresco (pf) de 13,2 g/100 g, 1,40 g/100 g, 0,40 g/100 g e 0,60 g/100 g, respetivamente. Em contraste, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2024) reportou valores gerais para a pitiaia, sem a especificação de espécie, indicando teores de hidratos de carbono, lípidos e proteínas em peso fresco (pf) de 15,2 g/100 g, 0,14 g/100 g e 0,36 g/100 g, respetivamente.

Nurul e Asmah (2014) compararam duas variedades de pitiaia vermelha (*H. polyrhizus*) cultivadas na Malásia e Austrália. Os resultados demonstraram diferenças entre as duas

variedades, sendo que as pitaias originárias da Malásia apresentaram teores de hidratos de carbono, proteínas e cinzas em peso fresco (pf) de  $12,97 \pm 0,11$  g/100 g,  $1,45 \pm 0,01$  g/100 g e  $0,54 \pm 0,01$  g/100 g, respetivamente, enquanto as pitaias cultivadas na Austrália apresentaram teores de hidratos de carbono, proteínas e cinzas em peso fresco (pf) de  $8,42 \pm 0,03$  g/100 g,  $0,41 \pm 0,01$  g/100 g e  $1,19 \pm 0,06$  g/100 g, respetivamente.

As discrepâncias observadas entre os dados obtidos neste estudo e por aqueles apresentados pelos autores reportados devem-se ao facto de os resultados deste trabalho serem expressos em peso seco (ps), enquanto os dados dos autores consultados são apresentados em peso fresco (pf). Assim, não é possível estabelecer uma comparação direta entre os resultados, apenas a confirmação da presença dos mesmos nutrientes nas diferentes espécies de pitaia.

**Tabela 4.** Composição centesimal e valor energético da polpa de Pitaia.

Composição centesimal (g/100 g ps)	
Polpa Pitaia	
Energia (kcal)	$396,5 \pm 0,2$
Lípidos	$3,61 \pm 0,04$
Saturados	$0,647 \pm 0,006$
Hidratos de carbono	$88,66 \pm 0,04$
Açúcares	$21,6 \pm 0,1$
Proteína	$6,35 \pm 0,02$
Cinza	$5,38 \pm 0,01$

### 3.3. Caracterização química das Farinhas e Polpa de Pitaia

#### 3.3.1. Açúcares solúveis livres

A caracterização dos açúcares solúveis livres totais presentes nas farinhas, realizada por HPLC-IR, está apresentada na **Tabela 5**. Os resultados indicam que a sacarose foi o único açúcar solúvel identificado, sendo o teor mais baixo observado na farinha de lentilha ( $0,53 \pm 0,01$  g/100 g). Em comparação com as outras farinhas, a farinha de grão-de-bico apresentou segundo menor teor de sacarose ( $1,06 \pm 0,01$  g/100 g), seguida da farinha de ervilha ( $1,08 \pm 0,02$  g/100 g) e, por último, da farinha de feijão ( $1,10 \pm 0,03$  g/100 g).

Brummer et al. (2015) e Kan et al. (2018) avaliaram a presença de açúcares na composição de diversas leguminosas, incluindo lentilhas, feijões, grãos-de-bico e ervilhas. Os resultados obtidos, tal como neste estudo, indicaram que a sacarose predominou em comparação com os demais açúcares analisados. Um padrão semelhante foi observado por Berrios et al. (2010) nas farinhas de lentilha, ervilha seca e grão-de-bico, corroborando a prevalência da sacarose em leguminosas.

**Tabela 5.** Identificação e quantificação dos açúcares solúveis livres nas farinhas de leguminosas por HPLC-IR (g/100 g ps).

Açúcares solúveis livres (g/100 g ps)				
	Farinha de Grão-de-Bico	Farinha de Feijão	Farinha de Ervilha	Farinha de Lentilha
Sacarose	$1,06 \pm 0,01^b$	$1,10 \pm 0,03^a$	$1,08 \pm 0,02^{a,b}$	$0,53 \pm 0,01^c$

Para cada linha da tabela, as diferenças significativas com  $\alpha=0,05$ ;  $p < 0,001$  entre as amostras são representadas por letras diferentes. ps - peso seco.

Relativamente à presença de açúcares solúveis livres na polpa da pitaia, os resultados estão descritos pela **Tabela 6**. De acordo com a literatura, os principais açúcares solúveis encontrados na polpa de pitaia são glucose e frutose (Arivalagan et al., 2021), resultado que foi igualmente observado neste estudo, onde a glucose foi identificada como o açúcar

solúvel mais abundante na polpa (58,45%), seguida da frutose (26,41%) e da trealose (15,14%). No entanto, Constantino et al. (2021) relataram, para esta mesma espécie, a presença de glucose e frutose em concentrações inferiores ao observado neste estudo, correspondente a  $5,95 \pm 0,17$  g/100 g pf e  $2,77 \pm 0,14$  g/100 g pf, respetivamente.

A literatura indica que a sacarose tende a ser encontrada em quantidades reduzidas na polpa da pitaia, uma vez que é frequentemente hidrolisada de forma irreversível em glucose e frutose durante o processo de maturação dos frutos (Wei et al., 2019).

Os dados observados relativos aos teores de açúcares solúveis livres na polpa da pitaia, reportados neste estudo, foram expressos em peso seco, ao contrário dos autores citados, que os apresentaram em peso fresco. Onde, a variação dos teores de açúcares encontrados neste estudo podem ser atribuídas a este facto, resultando em valores mais elevados, uma vez que os açúcares solúveis livres se apresentam mais concentrados no peso seco. Deste modo, não é possível realizar uma comparação direta entre os dados, sendo este estudo útil apenas para concluir que os mesmos compostos foram identificados em matrizes de origem distintas.

A ausência de sacarose na polpa da pitaia e os demais açúcares nas farinhas do presente estudo pode ser justificada pelo limite mínimo de deteção da técnica e equipamento utilizados.

**Tabela 6.** Identificação e quantificação dos açúcares solúveis livres na polpa da pitaia por HPLC-IR (g/100g ps).

Açúcares solúveis livres (g/100g ps)	
Polpa de Pitaia	
Frutose	$5,72 \pm 0,01$
Glucose	$12,66 \pm 0,03$
Trealose	$3,28 \pm 0,08$
Total	$21,7 \pm 0,1$

ps - peso seco.

### 3.3.2. Tocoferóis

A vitamina E, reconhecida como um importante agente antioxidante, pode ser subdividida em dois grupos, os tocoferóis e tocotrienóis. Os tocoferóis, em particular, são compostos por quatro isoformas principais:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocoferol. Destas quatro isoformas, o  $\alpha$ -tocoferol é a isoforma mais prevalente nos alimentos, sendo o principal responsável pela atividade biológica da vitamina E no organismo humano. O  $\gamma$ -tocoferol, por outro lado, é conhecido pela sua eficácia na prevenção da oxidação dos alimentos (Amarowicz & Pegg, 2008).

De acordo com os resultados apresentados na **Tabela 7**, não foi detetada a presença de  $\beta$ -tocoferol em nenhuma das farinhas analisadas. O  $\gamma$ -tocoferol foi identificado como o isómero mais abundante nas farinhas de leguminosas, representando entre 83,75 e 95,84% dos tocoferóis totais. As concentrações de  $\alpha$ - e  $\delta$ -tocoferol variam entre as diferentes farinhas, sugerindo que esses níveis estão dependentes das espécies de leguminosas analisadas.

As farinhas de feijão e ervilha apresentaram níveis relativamente elevados de  $\delta$ -tocoferol, com  $0,661 \pm 0,009$  mg/100 g e  $2,1 \pm 0,1$  mg/100 g, respetivamente, enquanto os teores de  $\alpha$ -tocoferol foram mais baixos, correspondendo a  $0,057 \pm 0,002$  mg/100 g e  $0,13 \pm 0,01$  mg/100 g, respetivamente. Em contraste, as farinhas de grão-de-bico e lentilha exibiram perfis opostos, com maiores percentagens de  $\alpha$ -tocoferol ( $6,2 \pm 0,1$  mg/100 g e  $1,42 \pm 0,04$  mg/100 g), e níveis mais baixos de  $\delta$ -tocoferol ( $2,3 \pm 0,1$  mg/100 g e  $0,179 \pm 0,004$  mg/100 g, respetivamente). Estes padrões de distribuição de tocoferóis nas mesmas leguminosas utilizadas neste estudo são consistentes com os valores reportados por Boschini e Arnoldi (2011).

Kan et al. (2018) concluíram que, entre as leguminosas analisadas no seu estudo, o grão-de-bico, feijão, ervilha e lentilha apresentaram na matriz as isoformas  $\gamma$ -tocoferol e  $\delta$ -tocoferol, enquanto o  $\alpha$ -tocoferol foi encontrado em concentrações relativamente mais baixas ou se encontra ausente.

**Tabela 7.** Identificação e quantificação dos tocoferóis nas farinhas de leguminosas utilizando a técnica de HPLC-fluorescência (mg/100g ps)

	Tocoferóis (mg/100g ps)			
	Farinha de Grão-de-Bico	Farinha de Feijão	Farinha de Ervilha	Farinha de Lentilha
$\alpha$ -tocoferol	6,2±0,1 <sup>a</sup>	0,057±0,002 <sup>c</sup>	0,13±0,01 <sup>c</sup>	1,42±0,04 <sup>b</sup>
$\gamma$ -tocoferol	43,8±0,2 <sup>a</sup>	16,57±0,08 <sup>d</sup>	20,4±0,03 <sup>c</sup>	23,6±0,2 <sup>b</sup>
$\delta$ -tocoferol	2,3±0,1 <sup>a</sup>	0,661±0,009 <sup>b</sup>	2,1±0,1 <sup>a</sup>	0,179±0,004 <sup>c</sup>
Total de tocoferóis	52,3±0,2 <sup>a</sup>	17,29±0,09 <sup>d</sup>	22,63±0,2 <sup>c</sup>	25,2±0,2 <sup>b</sup>

Para cada linha da tabela, as diferenças significativas com  $\alpha=0,05$ ;  $p<0,001$  entre as amostras são representadas por letras diferentes. ps – peso seco.

Nos resultados obtidos para a polpa da pitaiá (**Tabela 8**), verificou-se a presença de duas isoformas de vitamina E, nomeadamente  $\alpha$ -tocoferol (72,56%) e  $\gamma$ -tocoferol (27,44%), sendo estes os únicos tocoferóis detetados. Estes dados indicam a potencial capacidade antioxidante dos frutos de pitaiá, uma vez que o  $\alpha$ -tocoferol é a isoforma mais ativa biologicamente e o  $\gamma$ -tocoferol tem uma ação antioxidante importante, particularmente na prevenção da oxidação de lípidos.

A literatura existente acerca da composição de tocoferóis na polpa de pitaiá é ainda escassa, com a maioria dos estudos focando-se na casca e nas sementes ou apenas reportando os teores totais de vitamina E no fruto. Por exemplo Arivalagan et al. (2021), identificaram teores de vitamina E entre 75±59–182±35  $\mu\text{g}/100\text{g}$  pf nas polpas de pitaiás das variedades *H. polyrhizus* e *H. undatus*. Roriz et al. (2022) relataram a presença de todas as isoformas da vitamina E na casca da *H. costaricensis*.

Este facto sugere que, embora a polpa da pitaiá contenha uma quantidade considerável de tocoferóis, o potencial antioxidante global da fruta poderá estar concentrado em outros componentes, como a casca e as sementes, que muitas vezes são subvalorizados em estudos de caracterização nutricional.

**Tabela 8.** Identificação e quantificação dos tocoferóis na polpa da pitaia utilizando a técnica de HPLC-fluorescência (mg/100g ps)

Tocoferóis (mg/100g ps)	
Polpa de Pitaia	
$\alpha$ -tocoferol	4,62±0,07
$\gamma$ -tocoferol	1,747±0,004
Total	6,37±0,06

ps – peso seco.

### 3.3.3. Perfil de ácidos gordos

A análise do perfil de ácidos gordos nas farinhas (**Tabela 9**) revelou a presença de um total de 22 ácidos gordos, com uma predominância de ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) em relação aos demais ácidos gordos encontrados nas leguminosas.

Nas farinhas de grão-de-bico e ervilha, o ácido gordo predominante foi o ácido linoleico (C18:2n6c), com teores de  $47,7 \pm 0,4$  % para a farinha de grão-de-bico e  $55,299 \pm 0,007$  % para a farinha de ervilha. Por outro lado, nas farinhas de feijão e lentilha, os ácidos gordos maioritários foram o ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3n3) e oleico (C18:1n9c), com teores de  $41,71 \pm 0,04$  % para a farinha de feijão e  $31,9 \pm 0,6$  % para a farinha de lentilha. Embora os ácidos gordos predominantes nas farinhas de grão-de-bico, ervilha e feijão identificados neste estudo estejam em concordância com os resultados obtidos por Caprioli et al. (2016) e Khrisanapant et al. (2019), observou-se uma discrepância no perfil de ácidos gordos da farinha de lentilha. Em ambos os estudos referidos, o ácido linoleico foi identificado como o principal ácido gordo detetado na farinha de lentilha, representando 33,8-46,1 % e  $38,2 \pm 0,6$  g/100 g, seguido pelo ácido oleico com 23,5–39,6 % e  $28,06 \pm 0,35$  g/100 g.

Uma outra discrepância nos teores de ácidos gordos em leguminosas integrais moídas pode ser observada no estudo de Kan et al. (2018). Nos grãos-de-bico, lentilhas, feijões e ervilhas, os ácidos palmítico e oleico estiveram presentes na matriz destas. No entanto,

os grãos-de-bico destacaram-se pela presença do ácido esteárico (C18:0), enquanto a lentilha e o feijão apresentaram teores de ácido linoleico, e a ervilha foi caracterizada pelo elevado teor de ácido eicosanóico (C20:0).

Estas diferenças no perfil de ácidos gordos podem ser atribuídas a fatores como a variedade da matéria-prima, as condições de cultivo e o processamento das farinhas.

**Tabela 9.** Identificação e quantificação de ácidos gordos nas farinhas de leguminosas utilizando a técnica de CG-FID (%).

	Perfil de ácidos gordos (%)			
	Farinha de Grão-de-Bico	Farinha de Feijão	Farinha de Ervilha	Farinha de Lentilha
C12:0	nd	nd	0,096±0,004 <sup>a</sup>	0,072±0,006 <sup>b</sup>
C14:0	0,212±0,002 <sup>c</sup>	0,18±0,01 <sup>d</sup>	0,593±0,003 <sup>b</sup>	0,65±0,02 <sup>a</sup>
C15:0	0,073±0,003 <sup>d</sup>	0,132±0,008 <sup>c</sup>	0,233±0,005 <sup>a</sup>	0,164±0,001 <sup>b</sup>
C16:0	11,26±0,03 <sup>d</sup>	13,7±0,1 <sup>c</sup>	14,3±0,3 <sup>b</sup>	18,01±0,03 <sup>a</sup>
C16:1	0,23±0,01 <sup>c</sup>	0,237±0,005 <sup>c</sup>	0,293±0,008 <sup>a</sup>	0,248±0,001 <sup>b</sup>
C17:0	0,081±0,003 <sup>d</sup>	3,09±0,01 <sup>a</sup>	0,25±0,01 <sup>b</sup>	0,169±0,005 <sup>c</sup>
C18:0	nd	nd	nd	4,27±0,02
C18:1n9t	nd	nd	nd	0,43±0,01
C18:1n9c	27±0,1 <sup>b</sup>	8,56±0,05 <sup>d</sup>	25,5±0,2 <sup>c</sup>	31,9±0,6 <sup>a</sup>
C18:2n6t	nd	nd	0,447±0,006 <sup>a</sup>	0,192±0,003 <sup>b</sup>
C18:2n6c	55,299±0,007 <sup>a</sup>	27,9±0,1 <sup>d</sup>	47,7±0,4 <sup>b</sup>	30,6±0,3 <sup>c</sup>
C18:3n3	2,9±0,08 <sup>d</sup>	41,71±0,04 <sup>a</sup>	8,4±0,2 <sup>b</sup>	7,5±0,2 <sup>c</sup>
C20:0	1,013±0,002 <sup>b</sup>	0,8317±0,0006 <sup>c</sup>	1,00±0,06 <sup>b</sup>	1,20±0,01 <sup>a</sup>
C20:1	0,6±0,01 <sup>b</sup>	0,206±0,002 <sup>d</sup>	0,46±0,02 <sup>c</sup>	0,89±0,02 <sup>a</sup>
C20:2	nd	nd	nd	0,267±0,001
C21:0	nd	nd	nd	0,36±0,02
C22:0	0,86±0,01 <sup>c</sup>	2,05±0,03 <sup>a</sup>	nd	1,69±0,05 <sup>b</sup>
C22:1n9	nd	nd	0,46±0,02	nd
C20:5n3	nd	nd	nd	0,103±0,007
C23:0	0,123±0,004 <sup>c</sup>	0,359±0,007 <sup>a</sup>	0,24±0,01 <sup>b</sup>	0,35±0,02 <sup>a</sup>
C24:0	0,312±0,007 <sup>d</sup>	1,01±0,001 <sup>a</sup>	0,43±0,01 <sup>c</sup>	0,58±0,03 <sup>b</sup>
C22:6n3	nd	nd	nd	0,365±0,009
SFA	13,93±0,05 <sup>d</sup>	21,6±0,2 <sup>b</sup>	17,2±0,3 <sup>c</sup>	27,53±0,09 <sup>a</sup>
MUFA	27,87±0,09 <sup>b</sup>	8,76±0,06 <sup>d</sup>	26,2±0,2 <sup>c</sup>	33,5±0,5 <sup>a</sup>
PUFA	58,2±0,09 <sup>b</sup>	69,7±0,1 <sup>a</sup>	56,6±0,5 <sup>c</sup>	39±0,5 <sup>d</sup>

Para cada linha da tabela, as diferenças significativas com  $\alpha = 0,05$ :  $p < 0,001$  entre as amostras são representadas por letras diferentes. nd - não detetado.

Na quantificação do perfil de ácidos gordos na polpa de pitáia, descrita na **Tabela 10**, foram identificados e quantificados 16 ácidos gordos distintos. Tal como observado nas farinhas de leguminosas, os ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) foram predominantes, seguidos dos ácidos gordos monoinsaturados (MUFAs) e saturados (SFAs). Os principais ácidos gordos encontrados na polpa foram o ácido linoleico (C18:2n6c), o ácido oleico (C18:1n9c) e o ácido palmítico (C16:0), com o ácido linoleico a representar cerca de 50,8±0,4 %, enquanto os ácidos oleicos e palmíticos corresponderam a 25,7±0,2 % e 15,2±0,1 %, respetivamente.

O perfil de ácidos gordos obtido neste estudo é semelhante ao reportado por Jerônimo et al. (2015), que analisaram a variedade de pitáia *H. undatus*, vulgarmente conhecida como pitáia de casca vermelha e polpa branca. Nesse estudo, o ácido linoleico representou 50,87 % do total de ácidos gordos da fruta, seguido pelo ácido oleico, com 21,55 %, e pelo ácido palmítico, com 12,63 %.

Além da polpa, as sementes de pitáia destacam-se como uma excelente fonte de ácidos gordos. No estudo conduzido por Boyapati et al. (2023), as sementes de pitáia sujeitas a uma extração por solvente apresentaram elevada concentração de ácido linoleico, constituindo cerca de 54,81±0,07 %, seguido pelo ácido oleico, com 19,21±0,06 %, e pelo ácido palmítico, com 15,31±0,02 %. Estes dados são relevantes, pois demonstram que o perfil de ácidos gordos observado no presente estudo pode ser igualmente influenciado pelo perfil lipídico das sementes, uma vez que a polpa e as sementes de pitáia foram analisadas em conjunto.

O consumo de ácidos gordos polinsaturados, como o ácido linoleico e o ácido  $\alpha$ -linolénico, está associado à redução do colesterol total e ao aumento do HDL (colesterol “bom”), bem como à diminuição do risco de doenças cardiovasculares, incluindo a doença cardíaca coronária. Por outro lado, o consumo excessivo de ácidos gordos saturados tem um efeito adverso sobre o organismo humano, aumentando o risco de problemas cardiovasculares (FAO, 2010). Assim, pode inferir-se que tanto as farinhas de leguminosas como a polpa da pitáia podem trazer benefícios à saúde humana, devido ao seu elevado teor de PUFAs.

**Tabela 10.** Identificação e quantificação de ácidos gordos na polpa da pitaia utilizando a técnica de CG-FID (%).

Ácidos Gordos (%)	
Polpa de Pitaia	
C12:0	0,0333±0,0006
C14:0	0,229±0,005
C15:0	0,037±0,001
C16:0	15,2±0,1
C16:1	0,96±0,03
C17:0	0,0913±0,0006
C18:1n9c	25,7±0,2
C18:2n6c	50,8±0,4
C18:3n3	0,76±0,03
C20:0	1,89±0,05
C20:1	0,467±0,007
C22:1n9	3,3±0,2
C20:5n3	0,08±0,01
C22:2	0,0557±0,0006
C23:0	0,098±0,002
C24:0	0,38±0,02
SFA	17,9±0,2
MUFA	30,4±0,3
PUFA	51,7±0,4

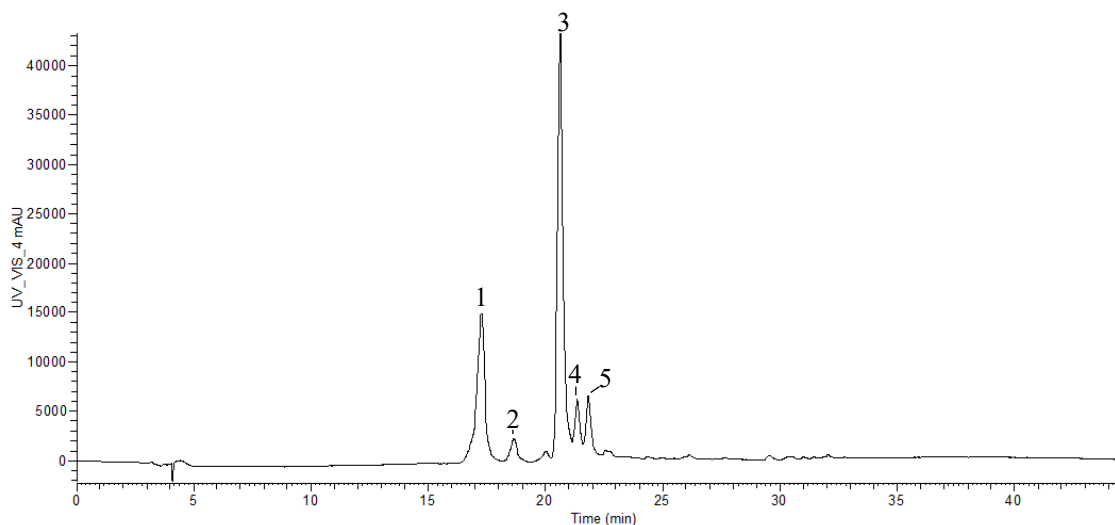
### 3.4. Quantificação e identificação de betalaínas

A quantificação e identificação das betalaínas presentes no extrato da casca da pitaia encontram-se descritas na **Tabela 11**. Com base nos picos cromatográficos apresentados na **Figura 12**, foram identificados de cinco compostos: betanina ( $[H]^+$  em ( $m/z$ ) 551), isobetanina ( $[H]^+$  em ( $m/z$ ) 551), filocactina ( $[H]^+$  em ( $m/z$ ) 637), 4'-O-malonil-betanina ( $[H]^+$  em ( $m/z$ ) 637) e isofilocactina ( $[H]^+$  em ( $m/z$ ) 637).

Relativamente à quantificação, o composto predominante no extrato foi a filocactina (pico 3), com uma concentração de  $22,8 \pm 0,4$  mg/g de extrato. O segundo composto mais abundante na amostra foi a betanina (pico 1), com  $12,7 \pm 0,3$  mg/g de extrato. Estes resultados mostram-se consistentes com os valores reportados por Roriz et al. (2022) e Xu et al. (2024), confirmando a predominância da filocactina e da betanina como compostos majoritários presentes na casca de pitaia.

**Tabela 11.** Resposta cromatográfica de betacianinas (tempo de retenção (Rt), comprimentos de onda de absorção máxima na região visível ( $\lambda_{max}$ ) e dados espectrais de massa (MS)) identificadas provisoriamente no extrato da casca de *H. costaricensis*.

Pico	Rt (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	$[H]^+$ ( $m/z$ )	MS <sup>2</sup>	Identificação provisória	Quantificação (mg/g de extrato)
1	17,2	532	551	389	Betanina	$12,7 \pm 0,3$
2	18,63	-	551	389	Isobetanina	$2,23 \pm 0,05$
3	20,6	534	637	593, 389, 619, 551	Filocactina	$22,8 \pm 0,4$
4	21,33	532	637	389, 593, 551	4'-O-malonil- betanina	$2,58 \pm 0,02$
5	21,81	532	637	593, 551, 389, 619	Isofilocactina	$3,05 \pm 0,04$
					<b>Total</b>	$43,4 \pm 0,8$



**Figura 12** - Separação por HPLC de betacianinas de pitáia vermelha *H. costaricensis* (a atribuição de cada pico é dada pela Tabela 11).  
(Autoria própria, 2024).

### 3.5. Caracterização dos *cupcakes*

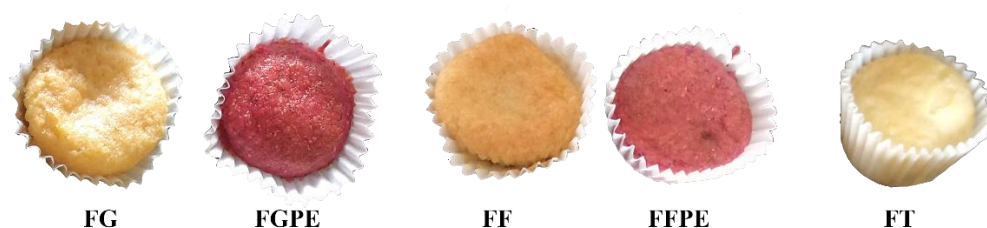
Os resultados obtidos no ensaio experimental demonstram que tanto o tempo de armazenamento (TA) como o tipo de farinha (TF) tiveram um impacto significativo nos parâmetros nutricionais analisados (lípidos, proteínas, cinzas, hidratos de carbono e energia) assim como no perfil químico (açúcares solúveis livres e perfil de ácidos gordos) e também nos diferentes parâmetros de textura e cor avaliada no desenvolvimento dos *cupcakes*. A análise estatística por ANOVA a dois fatores revela que não só os efeitos principais de TA e TF foram significativos (com valores de  $p < 0,001$  na maioria dos casos), mas também as interações entre estes dois fatores (TA×TF) mostraram significância estatística, com  $p < 0,001$  em todos os parâmetros avaliados.

As análises realizadas tiveram em consideração dois fatores: o tempo de armazenamento (TA), ao longo de um período de 6 dias, e o tipo de farinha (TF) utilizado na formulação. As diferentes formulações dos *cupcakes* diferem no tipo de farinha utilizada na sua confeção, incluindo farinha de feijão (FF), farinha de feijão adicionada com polpa e extrato de pitáia (FFPE), farinha de grão-de-bico (FG), farinha de grão-de-bico adicionada com polpa e extrato de pitáia (FGPE), assim como o *cupcake* controlo,

desenvolvido com farinha de trigo (FT). Na **Figura 13**, podem ser observados os *cupcakes* correspondentes a cada uma destas formulações.

As farinhas de lentilha (FL) e ervilha (FE) previamente mencionadas foram descartadas da aplicação nas formulações dos *cupcakes* devido à sua coloração, revelando-se um fator desfavorável para a aplicação subsequente do pigmento extraído da pitaia.

Estes dados fornecem uma análise comparativa dos diferentes efeitos que as farinhas e a adição de polpa de pitaia e extrato rico em betacianinas, recuperado a partir da casca de pitaia, têm na composição nutricional e fitoquímica dos *cupcakes*, permitindo uma avaliação da sua estabilidade ao longo do tempo de prateleira.



**Figura 13** - Diferentes formulações de *cupcake* com seus respectivos códigos; FG: *Cupcake* com farinha de grão-de-bico; FGPE: *Cupcake* com farinha de grão-de-bico adicionada de polpa e extrato de pitaia; FF: *Cupcake* com farinha de feijão; FFPE: *Cupcake* com farinha de grão-de-bico adicionada de polpa e extrato de pitaia; FT: *Cupcake* com farinha de trigo (controlo). (Autoria própria, 2024)

Os resultados da composição centesimal e perfil de açúcares solúveis livres e ácidos gordos dos *cupcakes* estão apresentados na **Tabela 12**.

### 3.5.1. Composição centesimal

Estes resultados indicam que os fatores TA e TF não podem ser avaliados de forma isolada, uma vez que a interação entre ambos tem um papel importante na variação observada. Por exemplo, o teor de lípidos, proteínas, cinzas, hidratos de carbono e o valor energético dos *cupcakes* foram todos significativamente afetados pela interação entre o tempo de armazenamento e o tipo de farinha, sugerindo que o efeito de um fator depende

do nível do outro. Esta interação indica que o comportamento nutricional dos *cupcakes* varia consoante a combinação de TA e TF, o que pode explicar diferenças no comportamento dos nutrientes ao longo do tempo, dependendo da composição da farinha utilizada.

Especificamente, no caso dos lípidos, o tempo de armazenamento e o tipo de farinha influenciam significativamente o teor lipídico do produto, com a interação entre os dois fatores a sugerir que certas farinhas podem conservar melhor a gordura durante o armazenamento. No que toca ao teor proteico, embora o TA tenha mostrado um efeito significativo, o TF apresentou um impacto ainda mais acentuado, com a interação TA×TF a indicar que a estabilidade proteica varia conforme o tipo de farinha. O teor de cinzas e os hidratos de carbono seguiram um padrão semelhante, refletindo alterações na estabilidade dos nutrientes ao longo do tempo em função do tipo de farinha e do tempo de armazenamento.

Em termos globais, o impacto do tipo de farinha e do tempo de armazenamento é interdependente, sendo que uma abordagem isolada de cada fator não seria adequada para explicar os resultados obtidos. Assim, a otimização de ambos os fatores, principalmente em função da estabilidade nutricional ao longo do tempo de prateleira, deve ser considerada na formulação de produtos de pastelaria como o *cupcake*, de modo a garantir a sua qualidade nutricional e consistência ao longo do tempo.

### 3.5.2. Perfil de açúcares solúveis livres e ácidos gordos

No ensaio experimental realizado, onde se avaliou a influência de dois fatores independentes — o tempo de armazenamento (TA) e o tipo de farinha (TF) — no desenvolvimento de *cupcakes*, os resultados da análise ANOVA a dois fatores indicaram que ambos os fatores influenciam de forma significativa a composição química do produto. Em particular, foi observado que tanto o TA como o TF, assim como a interação entre eles (TA×TF), apresentaram valores de  $p < 0,001$  para todas as variáveis analisadas, o que significa que ambos os fatores, bem como a sua interação, têm uma contribuição importante e significativa nas respostas observadas.

No caso dos açúcares solúveis livres, tanto o TA como o TF influenciam de maneira marcante o seu teor nos *cupcakes*, o que pode estar relacionado com o efeito de degradação ou transformação dos açúcares durante o armazenamento, dependendo do tipo de farinha utilizado. A interação significativa entre TA e TF ( $p < 0,001$ ) sugere que o impacto do tempo de armazenamento nos açúcares solúveis livres varia consoante o tipo de farinha, possivelmente devido a diferenças nas características físico-químicas das farinhas.

Relativamente aos ácidos gordos, foram analisados vários componentes específicos, incluindo C16:0, C18:0, C18:1n9c, C18:2n6c e C18:3n3, bem como os grupos totais de ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA). Em todos os casos, os valores de  $p$  para TA, TF e a interação TA×TF foram inferiores a 0,001, o que confirma que tanto o tempo de armazenamento como o tipo de farinha têm um impacto significativo nos perfis de ácidos gordos dos *cupcakes*. Esta interação indica que o efeito do tempo de armazenamento nos ácidos gordos varia de acordo com o tipo de farinha, sugerindo que algumas farinhas podem proteger melhor os ácidos gordos contra oxidação ou degradação ao longo do tempo.

Os ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA) também revelaram interações significativas entre TA e TF, reforçando a ideia de que a estabilidade e o comportamento dos lípidos no produto final dependem da combinação destes dois fatores. A presença de interações significativas para todos os ácidos gordos analisados (com valores de  $p < 0,001$ ) aponta para uma relação complexa entre a formulação (tipo de farinha) e as condições de armazenamento, que deve ser considerada na formulação e desenvolvimento de produtos de pastelaria, de forma a maximizar a estabilidade e a qualidade nutricional ao longo do tempo.

Em suma, os resultados mostram que o tipo de farinha e o tempo de armazenamento influenciam significativamente tanto os açúcares solúveis livres como os perfis de ácidos gordos nos *cupcakes*, com interações significativas entre estes fatores a indicar que a combinação de TA e TF tem um impacto determinante na composição química e, potencialmente, na qualidade e estabilidade do produto final. Estes achados sublinham a importância de considerar a interação entre ingredientes e condições de armazenamento ao formular produtos de pastelaria.

**Tabela 12.** Composição centesimal dos diferentes *cupcakes*, ao longo do tempo de armazenamento de 6 dias, (secção esquerda); expresso em g/100 g de pf; Açúcares solúveis livres (secção intermédia) g/100 g de ps de ácidos gordos (secção direita), % relativa.

<i>Cupcakes</i>															
Composição centesimal							Açúcares solúveis livres	Ácidos gordos							
		Lípidos	Proteínas	Cinza	H. Carb.	Energia (kcal)	Sacarose	C16:0	C18:0	C18:1n9c	C18:2n6c	C18:3n3	SFA	MUFA	PUFA
<b>Tempo de armazenamento (TA)</b>	0 dias	16±2	9±2	5±1	70±4	464±6	72±9	12,8±0,9	4,43±0,2	23,6±0,6	52,5±0,5	6,7±0,6	17,2±0,9	23,6±0,6	59,2±0,5
	3 dias	16±1	10±2	5±1	70±4	462±4	72±7	12,6±0,7	4,61±0,3	25±3	51±3	6,7±0,6	17,1±0,5	25±3	58±2
	6 dias	16±2	9±2	5±1	70±4	460±9	73±7	12,3±0,8	4,57±0,2	25±2	52±2	6,6±0,5	16,8±0,8	25±2	59±2
<b>p-valor (n=15)</b>	ANOVA	<0,001	0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<b>Tipo de Farinha (TF)</b>	FT	14,0±0,4	6,1±0,3	2,6±0,1	77,2±0,8	459±2	58±2	13,0±0,6	4,52±0,2	23,3±0,2	52,8±0,2	6,41±0,1	17,4±0,4	23,2±0,2	59,2±0,2
	FF	16,9±0,2	11,0±0,4	5,2±0,1	68,9±0,4	464±1	74±1	11,5±0,5	4,78±0,3	28±3	49±3	7,53±0,3	16,2±0,5	28±3	56±3
	FFPE	15±1	10,4±0,4	5,7±0,1	69±2	453±6	76,7±0,7	12,9±0,3	4,60±0,04	23,2±0,1	52,0±0,1	7,23±0,04	17,5±0,3	23,2±0,1	59,2±0,2
	FG	16,8±0,3	10,1±0,4	4,7±0,3	68,5±0,3	465±2	75±1	12,1±0,2	4,31±0,2	24,2±0,2	53,1±0,2	6,25±0,2	16,4±0,3	24,2±0,2	59,4±0,2
	FGPE	18,0±0,1	9,5±0,4	4,8±0,3	68±1	471±5	77,8±0,5	13,5±0,5	4,48±0,2	23,1±0,2	52,8±0,4	6,09±0,1	17,8±0,4	23,2±0,2	59,0±0,4
<b>p-valor (n=15)</b>	ANOVA	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<b>TA×TF (n=46)</b>	p-valor	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Em cada coluna, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas. Os desvios padrões apresentados foram calculados a partir de resultados obtidos em diferentes condições de operação. Assim, não devem ser considerados como uma medida de precisão, mas sim como um intervalo de valores. ps - peso seco. pf – peso fresco.

### 3.6. Análises físicas dos *cupcakes* produzidos

A qualidade comercial de pães, bolos e massas depende da textura e das características sensoriais, são geralmente determinadas pelas propriedades físico-químicas dos ingredientes utilizados. Desta forma, a produção de pães sem glúten e sem ovos impacta diretamente as propriedades reológicas da massa, especialmente no que diz respeito à elasticidade, resiliência e viscoelasticidade, resultando em produtos com maior índice de expansão e dureza (Xu et al., 2020; Yazici & Ozer, 2021).

Entre os parâmetros analisados, a dureza está diretamente relacionada à resistência durante a mastigação, enquanto a mastigabilidade refere-se ao tempo e à energia necessários para mastigar o alimento até atingir a consistência adequada para a deglutição. Outro parâmetro analisado foi a coesão, definida como a capacidade de um alimento resistir à desintegração durante deformação. No que diz respeito ao parâmetro de adesividade, este é definido pela força negativa gerada pela viscosidade do alimento. Já a elasticidade refere-se à capacidade de um alimento de sofrer deformação sem se romper. O parâmetro de gomosidade está relacionado com a coesão, e refere-se à força necessária para desintegrar um alimento até ao ponto ideal de deglutição (ISO, 2008; Assis et al., 2020; Soupepe et al., 2025).

A incorporação da polpa e do extrato rico em betacianinas, extraído da casca da pituaia, na formulação dos *cupcakes* conferiu uma coloração ao produto final. Após o processo de cozedura, foram realizados ensaios para a análise da textura e da cor dos *cupcakes*, cujos resultados estão apresentados na **Tabela 13**.

#### 3.6.1. Análise de textura

No ensaio experimental conduzido para avaliar a influência do tempo de armazenamento (TA) e do tipo de farinha (TF) no desenvolvimento de *cupcakes*, os resultados obtidos através da ANOVA a dois fatores indicaram que ambos os fatores influenciam significativamente as propriedades de textura do produto. O tratamento estatístico permitiu observar que, para a maioria das dimensões de textura analisadas, os fatores TA e TF, bem como a interação entre eles (TA×TF), tiveram um efeito significativo

(valores de  $p < 0,05$ ), refletindo a relevância de ambos os fatores na variação dos resultados.

Em termos de dureza, tanto o TA quanto o TF apresentaram um impacto significativo ( $p < 0,001$ ), com uma interação igualmente significativa entre ambos, indicando que o tipo de farinha influencia a forma como o tempo de armazenamento afeta a firmeza dos *cupcakes*. Este resultado sugere que diferentes tipos de farinha podem modificar a resistência ao endurecimento do produto ao longo do tempo.

Para a adesividade, verificou-se também um efeito significativo para TA e TF ( $p < 0,001$ ), assim como uma interação significativa entre os dois fatores ( $p = 0,0008$ ), o que indica que o tempo de armazenamento afeta a adesividade de maneira diferenciada conforme o tipo de farinha utilizado. Tal pode estar relacionado com as variações nas propriedades de absorção de umidade e gelatinização do amido das diferentes farinhas, que influenciam a textura superficial do *cupcake*.

A resiliência apresentou um valor de  $p = 0,0007$  para TA e  $p < 0,001$  para TF, com uma interação significativa ( $p = 0,005$ ). Esta interação sugere que o tipo de farinha modula a capacidade do *cupcake* de recuperar a sua forma após a compressão durante o armazenamento, possivelmente devido a diferenças na estrutura proteica das farinhas.

Para a coesão, observou-se um efeito significativo para TF ( $p < 0,001$ ) e uma interação significativa entre TA e TF ( $p = 0,021$ ), embora o efeito de TA isolado não tenha sido significativo ( $p = 0,099$ ). Isto indica que o tipo de farinha tem um papel mais relevante na integridade estrutural do produto, mas que o tempo de armazenamento também pode influenciar, dependendo do tipo de farinha.

No caso da elasticidade, o fator TA não apresentou efeito significativo ( $p = 0,285$ ), ao contrário de TF ( $p < 0,001$ ), sendo que a interação TA×TF também não foi significativa ( $p = 0,888$ ). Este resultado sugere que o tipo de farinha desempenha o papel principal na elasticidade do *cupcake*, enquanto o tempo de armazenamento parece ter uma influência mínima.

A gomosidade foi significativamente afetada tanto por TA como por TF ( $p < 0,001$  para ambos), assim como pela interação TA×TF, sugerindo que a consistência mastigável do produto se altera em função do tempo de armazenamento e do tipo de farinha, com

variações importantes na forma como estes fatores interagem para influenciar esta característica.

Por fim, a mastigabilidade apresentou valores de  $p = 0,001$  para TA e TF, indicando um efeito significativo de ambos os fatores, mas a interação TA×TF não foi significativa ( $p = 0,476$ ), sugerindo que a influência do tempo de armazenamento e do tipo de farinha neste parâmetro ocorre de forma independente, sem interação relevante.

Em suma, os resultados indicam que o tipo de farinha e o tempo de armazenamento influenciam de forma significativa várias propriedades de textura dos *cupcakes*, com interações significativas observadas para dureza, adesividade, resiliência, coesão e gomosidade. Contudo, para elasticidade e mastigabilidade, não foram registradas interações significativas, sugerindo que estes parâmetros são afetados de forma independente por TA e TF. Estes achados sublinham a importância de considerar tanto o tipo de farinha quanto as condições de armazenamento ao otimizar a textura dos produtos de panificação, visando a sua qualidade sensorial ao longo do tempo.

### 3.6.2. Análise de cor

No ensaio experimental que avaliou a influência do tempo de armazenamento (TA) e do tipo de farinha (TF) nas características de cor dos *cupcakes*, foi aplicada uma ANOVA a dois fatores para examinar os efeitos individuais e combinados destes fatores. Os resultados mostraram que tanto TA como TF influenciam de forma significativa vários parâmetros de cor, tanto na parte externa como interna do *cupcake*, e que a interação entre estes dois fatores (TA×TF) também desempenha um papel relevante em vários casos.

Para o parâmetro de luminosidade externa ( $L^*$ ), o tempo de armazenamento não teve um efeito significativo ( $p = 0,067$ ), mas o tipo de farinha influenciou fortemente este parâmetro ( $p < 0,001$ ), assim como a interação entre TA e TF ( $p < 0,001$ ). Este resultado sugere que, enquanto o tempo de armazenamento por si só não altera de forma significativa a luminosidade externa, o tipo de farinha afeta diretamente esta característica, e a combinação entre ambos os fatores pode amplificar esse efeito.

No caso do parâmetro  $a^*$  externo, tanto o TA como o TF apresentaram efeitos significativos ( $p < 0,001$ ), assim como a interação entre os dois fatores ( $p < 0,001$ ). Isso

indica que o tempo de armazenamento e o tipo de farinha influenciam a tonalidade vermelha/verde da superfície do *cupcake*, sendo que o efeito combinado de ambos pode alterar a coloração de maneira complexa.

O parâmetro  $b^*$  externo, que representa a tonalidade amarela/azul, também foi significativamente afetado pelo TA ( $p = 0,003$ ), pelo TF ( $p < 0,001$ ) e pela interação TA×TF ( $p < 0,001$ ). Este resultado sugere que o tempo de armazenamento altera ligeiramente o tom amarelado da parte externa do *cupcake*, mas a interação com o tipo de farinha exerce uma influência ainda maior, modulando as mudanças de cor ao longo do tempo.

Em relação à luminosidade interna ( $L^*$ ), tanto o TA ( $p = 0,030$ ) quanto o TF ( $p < 0,001$ ) tiveram um impacto significativo, com a interação TA × TF também apresentando significância ( $p = 0,0004$ ). Isso sugere que a cor interna do *cupcake* é afetada por ambos os fatores, sendo que o tipo de farinha, em particular, exerce um efeito predominante, influenciando como o produto retém ou reflete a luz internamente.

Para o parâmetro  $a^*$  interno, o TA não apresentou um efeito significativo ( $p = 0,240$ ), enquanto o TF mostrou um impacto significativo ( $p < 0,001$ ). A interação TA×TF não foi significativa ( $p = 0,171$ ), indicando que a tonalidade vermelha/verde no interior do *cupcake* é influenciada principalmente pelo tipo de farinha, sem que o tempo de armazenamento ou a combinação dos dois fatores tenha um efeito notável.

Já o parâmetro  $b^*$  interno, que reflete a tonalidade amarela/azul, foi significativamente afetado pelo TA ( $p = 0,0007$ ), pelo TF ( $p < 0,001$ ) e pela interação TA×TF ( $p = 0,002$ ). Este resultado sugere que o tempo de armazenamento e o tipo de farinha influenciam de maneira notável o tom amarelado interno do *cupcake*, com uma interação significativa que demonstra que a mudança de cor interna ao longo do tempo depende da combinação de ambos os fatores.

Em conclusão, os resultados indicam que o tipo de farinha (TF) exerce um papel fundamental na modulação da cor dos *cupcakes*, tanto interna como externamente, e que o tempo de armazenamento (TA) também influencia alguns parâmetros, particularmente quando em interação com o TF. As interações significativas entre TA e TF para vários parâmetros de cor, como  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , demonstram que a combinação destes fatores tem um impacto importante na aparência final do produto, sendo crucial considerar tanto o

tipo de farinha quanto o tempo de armazenamento ao formular produtos de pastelaria que visam manter a qualidade visual ao longo do tempo.

**Tabela 13.** Diferentes dimensões de Textura dos diferentes *cupcakes*, ao longo do tempo de armazenamento de 6 dias, (secção esquerda); e as coordenadas Cielab da leitura de cor interna e externa (secção direita).

		<i>Cupcakes</i>								Cor						
		Dimensões de Textura								Externa			Interna			
		Dureza (g)	Adesividade (g.sec)	Resiliencia (%)	Coesão (%)	Elasticidade (%)	Gomosidade	Mastigabilidade			<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *
Tempo de armazenamento (TA)	0 dias	142±55	-22,1±12	28,0±4,1	0,64±0,05 <sup>a</sup>	108±40	90±35	91±30 <sup>a</sup>			53±13	12±10	26±8	57±9	8±11 <sup>a</sup>	27±5
	3 dias	185±63	-15,3±8	29,2±3,7	0,64±0,05 <sup>a</sup>	124±49	119±40	153±84 <sup>a,b</sup>			52±12	11±10	26±7	57±9	8±11 <sup>a</sup>	27±5
	6 dias	219±94	-5,42±3,8	30,4±4,1	0,65±0,06 <sup>a</sup>	130±80	144±51	173±117 <sup>b</sup>			52±12	10±9	27±5	58±9	8±11 <sup>a</sup>	28±5
<i>p</i> -valor (n=15)	ANOVA	<0,001	<0,001	0,0007	0,099	0,285	<0,001	0,001			0,067	<0,001	0,003	0,030	0,240	0,0007
Tipo de Farinha (TF)	FT	103±38	-2,3±2,2	34±3	0,73±0,01 <sup>b</sup>	183±75 <sup>b</sup>	76±28	131±97 <sup>a,b</sup>			66,9±1,7	-0,5±0,2	27±1	64±2	-1,97±0,23 <sup>a</sup>	20±1
	FF	222±92	-18±10	25±3	0,62±0,03 <sup>a</sup>	97±2 <sup>a</sup>	164±55	162±49 <sup>a,b</sup>			54,9±3,8	7±1	31±1	64±2	0,57±0,28 <sup>b</sup>	27±2
	FFPE	222±51	-16±11	31±2	0,63±0,03 <sup>a</sup>	130±80 <sup>a,b</sup>	143±30	205±147 <sup>b</sup>			39,0±1,1	23±2	20±2	48±1	20±2 <sup>c</sup>	26±1
	FG	151±39	-17±8	26±3	0,63±0,04 <sup>a</sup>	98±1 <sup>a</sup>	99±34	99±35 <sup>a</sup>			63±1	4±1	33±2	65±2	-0,03±0,58 <sup>b</sup>	34±1
	FGPE	168±37	-19±13	30±2	0,62±0,03 <sup>a</sup>	94±3 <sup>a</sup>	106±23	97±18 <sup>a</sup>			37±1	22±1	19±3	45±3	22±1 <sup>d</sup>	28±2
<i>p</i> -valor (n=15)	ANOVA	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,001			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
TA×TF (n=46)	<i>p</i> -valor	<0,001	0,0008	0,005	0,021	0,888	<0,001	0,476			<0,001	<0,001	<0,001	0,0004	0,171	0,002

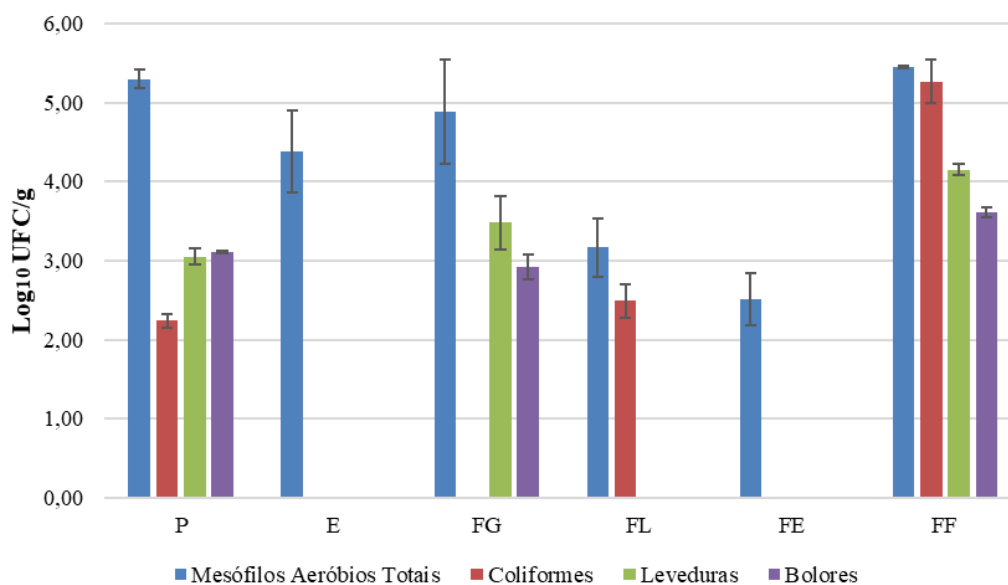
Em cada coluna, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas. Os desvios padrões apresentados foram calculados a partir de resultados obtidos em diferentes condições de operação. Assim, não devem ser considerados como uma medida de precisão, mas sim como um intervalo de valores.

### 3.7. Análises microbiológicas

Foi avaliado o crescimento microbiano para as farinhas de leguminosas, polpa e extrato da casca da pitaia destinados à incorporação nos *cupcakes*. Os resultados desta análise encontram-se representados na **Figura 14**.

No que se diz respeito às farinhas estudadas, a FF foi a que apresentou maior crescimento microbiológico, evidenciado por contagens mais elevadas de mesófilos aeróbios totais, coliformes, leveduras e bolores, em comparação com as restantes farinhas. No caso dos coliformes, não se verificou crescimento em FE e FG, enquanto FL e FE não apresentaram desenvolvimento de bolores e leveduras. Relativamente ao extrato da casca de pitaia, não foi observado crescimento de bolores e leveduras, tendo-se apenas a presença de mesófilos aeróbios totais. A contagem de coliformes no extrato não foi realizada devido à quantidade insuficiente da amostra disponível, o que inviabilizou a análise. Quanto à polpa de pitaia, a contagem de mesófilos aeróbios totais foi a mais elevada, seguida de bolores, leveduras e coliformes.

Face à ausência de legislação específica para farinhas de leguminosas, procedeu-se à comparação direta dos resultados com a legislação aplicável aos géneros alimentares, conforme estabelecido pelo Regulamento (CE) 2073/2005. Dentre as farinhas analisadas, apenas FF excedeu os limites máximos permitidos para leveduras ( $10^4$  UFC/g) e coliformes ( $10^2$  UFC/g). por conseguinte, a polpa da pitaia e as restantes farinhas foram aceitáveis do ponto de vista microbiológico.



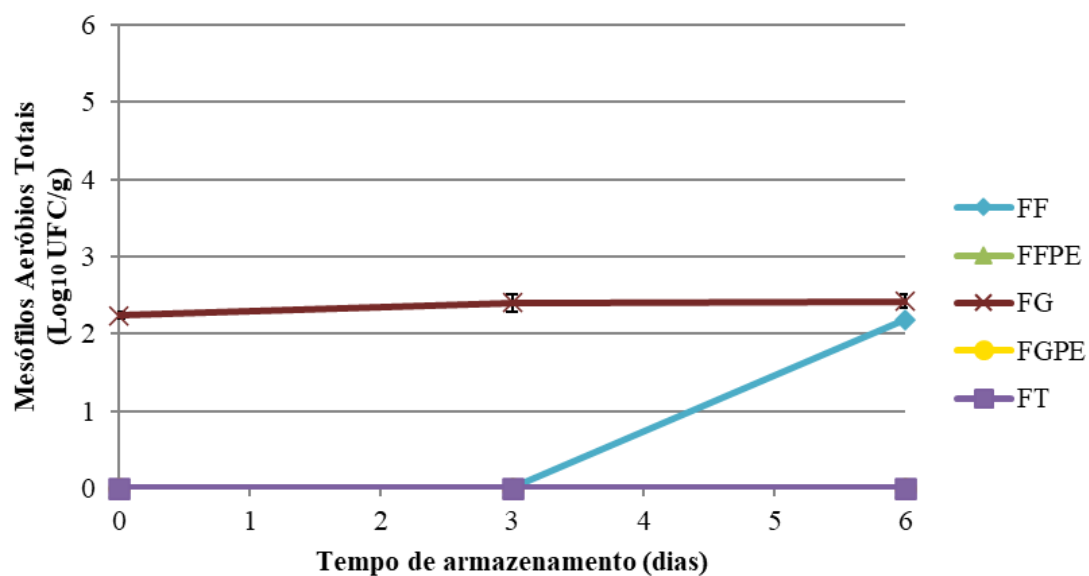
**Gráfico 1** – Representação gráfica do crescimento microbiano nas diferentes matérias-primas.

Após a produção dos *cupcakes*, realizaram-se análises microbiológicas para a quantificação de mesófilos aeróbios totais, bolores e leveduras ao longo do período de armazenamento de 0, 3 e 6 dias, conforme o representado pela **Figura 15**, a fim de se verificar se o tratamento térmico foi adequado para a redução da carga microbiana dos *cupcakes*, de acordo com os parâmetros estabelecidos para a segurança alimentar.

Os *cupcakes* preparados com FFPE, FGPE e FT registaram contagem de mesófilos aeróbios totais a 30°C de 1 UFC/g. Em contraste, os *cupcakes* à base de FF apresentaram um aumento na contagem de mesófilos aeróbios totais entre os dias 3 e 6, atingindo aproximadamente 2,18 log<sub>10</sub> UFC/g ao final do período de armazenamento. Os *cupcakes* contendo FG foram os únicos a apresentar um crescimento microbiano contínuo ao longo dos 6 dias, com valores variando de 2,24 a 2,42 log<sub>10</sub> UFC/g, respectivamente.

Assim, todos os *cupcakes* apresentaram resultados microbiológicos satisfatórios, de acordo com os valores-guia estabelecidos pelo INSA (2019) para os subgrupos 1B (<4 log<sub>10</sub> UFC/g) referentes a alimentos totalmente cozinhados e manuseados após o tratamento térmico; e 2B (<5 log<sub>10</sub> UFC/g) para alimentos compostos cozinhados

contendo frutas. Estes resultados indicam que o processo de cozedura foi adequado, prevenindo o desenvolvimento de microrganismos patogénicos ao longo do período de armazenamento analisado.



**Gráfico 2** - Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos ao longo de 6 dias.





# Capítulo 4



#### 4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

A caracterização centesimal e química das farinhas de leguminosas revelou teores elevados de hidratos de carbono e proteínas, sendo observado um conteúdo significativo de lípidos na FG e de açúcares solúveis livres na FF. A polpa da pitaia também se demonstrou rica em hidratos de carbono, açúcares solúveis livres e proteínas. Tanto as farinhas de leguminosas como a polpa da pitaia eram predominantemente compostas por ácidos gordos polinsaturados. No que concerne à presença de tocoferóis, foram identificadas duas isoformas na polpa da pitaia, com predominância de  $\alpha$ -tocoferol (72,56%), e três isoformas nas farinhas de leguminosas, com o  $\gamma$ -tocoferol a ser o mais abundante (83,75-95,84%).

Os compostos de betacianinas presentes na casca da pitaia foram extraídos através do processo de extração assistida por ultrassom, o que resultou na identificação de cinco betacianinas: betanina, isobetanina, filocactina, 4'-O-malonil-betanina e isofilocactina, apresentando um teor máximo de betacianinas totais de  $43,4 \pm 0,8$  mg/g de extrato.

Com base nos resultados observados neste estudo, foram desenvolvidos *cupcakes* isentos de glúten, com substituição total da FT por farinhas de leguminosas. Para além disso, foram eliminados alergénios como ovos e leite, substituídos pela utilização da aquafaba, em conjunto com a adição da polpa e extrato rico em pigmentos naturais extraídos a partir da casca da pitaia. Os *cupcakes* desenvolvidos com a polpa e extrato da pitaia apresentaram uma coloração avermelhada vibrante e maior dureza quando comparados com os *cupcakes* controlo, que continham FT. De um modo geral, os *cupcakes* contendo farinhas de leguminosas apresentaram teores superiores de lípidos, proteínas, cinzas, valor energético e açúcares solúveis livres em comparação com os *cupcakes* controlo. O perfil de ácidos gordos observados nas farinhas de leguminosas e FT foi comparativamente semelhante, sendo dominado por ácidos gordos polinsaturados.

Do ponto de vista nutricional, os *cupcakes* preparados com as farinhas de leguminosas e adicionados da polpa e extrato de pitaia demonstraram diferenças significativas entre si. Os *cupcakes* contendo FF registaram maiores teores de proteínas, hidratos de carbono e cinzas, em comparação com os *cupcakes* com FG, que apresentaram um teor superior de lípidos, sacarose e valor energético. De modo geral, os *cupcakes* formulados com FF

revelaram-se mais adequados em comparação com os que utilizam FG, devido ao menor teor de sacarose e ao maior conteúdo proteico. Embora os produtos à base de farinhas de leguminosas apresentem níveis de sacarose mais elevados em relação aos de FT, o maior teor de proteínas presente na matriz de FF pode favorecer a estabilização dos níveis de glicose no organismo, sendo este um facto relevante, dado que indivíduos com doença celíaca apresentam uma predisposição aumentada para o desenvolvimento de diabetes tipo I. Por outro lado, em termos de textura, os *cupcakes* produzidos com FG demonstraram menor dureza e mastigabilidade em comparação aos *cupcakes* contendo FF, podendo vir a influenciar futuramente a aceitabilidade sensorial deste produto pelos consumidores.

As análises microbiológicas dos *cupcakes* após 6 dias demonstraram conformidade com os limites máximos estabelecidos pela legislação vigente na UE, sugerindo a possibilidade de um tempo de armazenamento superior ao estudado.

Assim, os resultados deste estudo contribuíram para uma compreensão mais aprofundada do perfil nutricional, químico e microbiológico das farinhas de leguminosas, sublinhando a viabilidade da sua aplicação como ingrediente em produtos de pastelaria, como *cupcakes*. Adicionalmente, este estudo evidenciou a aplicabilidade de matrizes pouco exploradas neste tipo de produtos de pastelaria, permitindo a exclusão de ingredientes como leite e ovos, contribuindo positivamente como uma alternativa para o desenvolvimento de novos produtos destinados a consumidores com intolerâncias e alergias alimentares resultantes de doenças ou condições imunológicas.

Para investigações futuras, é sugerida a realização de análise de granulometria das farinhas estudadas, análises sensoriais, bem como a determinação dos parâmetros de acidez, pH e atividade de água ( $a_w$ ) nos produtos desenvolvidos, uma vez que são fatores que influenciam diretamente o tempo de prateleira e a aceitação pelos consumidores. Adicionalmente, seria importante uma análise de mercado para a comparação de preços dos produtos.

## REFERÊNCIAS

- Abedi-Firoozjah, R., Parandi, E., Heydari, M., Kolahdouz-Nasiri, A., Bahraminejad, M., Mohammadi, R., Rouhi, M., & Garavand, F. (2023). Betalains as promising natural colorants in smart/active food packaging. *Food Chemistry*, 424(136408), 136408. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136408>
- Aguirre-Joya, J. A., Chacón-Garza, L. E., Valdivia-Najár, G., Arredondo-Valdés, R., Castro-López, C., Ventura-Sobrevilla, J. M., Aguilar-González, C. N., & Boone-Villa, D. (2020). Nanosystems of plant-based pigments and its relationship with oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 143(111433), 111433. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111433>
- Allegra, M., Tutone, M., Tesoriere, L., Almerico, A. M., Culetta, G., Livrea, M. A., & Attanzio, A. (2019). Indicaxanthin, a multi-target natural compound from *Opuntia ficus-indica* fruit: From its poly-pharmacological effects to biochemical mechanisms and molecular modelling studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 179, 753–764. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.07.006>
- Amarowicz, R., & Pegg, R. B. (2008). Legumes as a source of natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology: EJLST*, 110(10), 865–878. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800114>
- Ammar, I., Sebi, H., Aloui, T., Attia, H., Hadrich, B., & Felfoul, I. (2022). Optimization of a novel, gluten-free bread's formulation based on chickpea, carob and rice flours using response surface design. *Heliyon*, 8(12), e12164. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12164>
- Antunes, L. M. G., & Araújo, M. C. P. (2000). Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. *Revista de Nutrição*, 13(2), 81–88. <https://doi.org/10.1590/s1415-52732000000200002>
- Araújo, H. M. C., Araújo, W. M. C., Botelho, R. B. A., & Zandonadi, R. P. (2010). Doença celíaca, hábitos e práticas alimentares e qualidade de vida. *Revista de Nutrição*, 23(3), 467–474. <https://doi.org/10.1590/s1415-52732010000300014>

- Arivalagan, M., Karunakaran, G., Roy, T. K., Dinsha, M., Sindhu, B. C., Shilpashree, V. M., Satisha, G. C., & Shivashankara, K. S. (2021). Biochemical and nutritional characterization of dragon fruit (*Hylocereus* species). *Food Chemistry*, 353(129426), 129426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129426>
- Assis, I. C. L., Silva, N. A. B. da, Silva, W. L. M. da, Arruda, A. C. & Trombete, F. M. (2020). Efeitos da adição de fibras de psyllium no perfil de textura instrumental e na aceitação sensorial de bolo de arroz sem glúten. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 6(1), 56-60. <https://doi.org/10.36229/978-65-86127-36-2.CAP.09>
- Association of Official Analytical Chemists (2015). Official Methods of Analysis. 18th Edition, AOAC, Arlington, 806-814.
- Azeredo, H. M. C. (2009). Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), 2365–2376. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01668.x>
- Berrios, J. D. J., Morales, P., Cámara, M., & Sánchez-Mata, M. C. (2010). Carbohydrate composition of raw and extruded pulse flours. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 43(2), 531–536. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.035>
- Boschin, G., & Arnoldi, A. (2011). Legumes are valuable sources of tocopherols. *Food Chemistry*, 127(3), 1199–1203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.124>
- Boyapati, T., Rana, S. S., & Ghosh, P. (2023). Microwave-assisted extraction of dragon fruit seed oil: Fatty acid profile and functional properties. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 22(3), 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2022.08.001>
- Brummer, Y., Kaviani, M., & Tosh, S. M. (2015). Structural and functional characteristics of dietary fibre in beans, lentils, peas and chickpeas. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 67, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.009>
- Cai, Y.-Z., Sun, M., & Corke, H. (2005). Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.03.020>

- Calva-Estrada, S. J., Jiménez-Fernández, M., & Lugo-Cervantes, E. (2022). Betalains and their applications in food: The current state of processing, stability and future opportunities in the industry. *Food Chemistry. Molecular Sciences*, 4(100089), 100089. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100089>
- Caprioli, G., Giusti, F., Ballini, R., Sagratini, G., Vila-Donat, P., Vittori, S., & Fiorini, D. (2016). Lipid nutritional value of legumes: Evaluation of different extraction methods and determination of fatty acid composition. *Food Chemistry*, 192, 965–971. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.102>
- Carmen, F., Frances, C., & Barthe, L. (2023). Trends on valorization of pitaya fruit biomass through value-added and green extraction technology – A critical review of advancements and processes. *Trends in Food Science & Technology*, 138, 339–354. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.06.014>
- Cheng, F., Ding, K., Yin, H., Tulbek, M., Chigwedere, C. M., & Ai, Y. (2023). Milling and differential sieving to diversify flour functionality: A comparison between pulses and cereals. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 163(112223), 112223. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112223>
- Comissão Europeia. (2005). *Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão, de 15 de novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios (Texto relevante para efeitos do EEE)*. Jornal Oficial da União Europeia.
- Comissão Europeia. (2014). *Regulamento de Execução (UE) n.º 828/2014 da Comissão, de 30 de julho de 2014, relativo aos requisitos de prestação de informações aos consumidores sobre a ausência ou a presença reduzida de glúten nos géneros alimentícios (Texto relevante para efeitos do EEE)*. Jornal Oficial da União Europeia.
- Constantino, L. V., Zeffa, D. M., Ventorim, M. F., Gonçalves, L. S. A., Marcos, A. W., Sanzovo, A. W. dos S., Rossetto, L. M., Alves, S. M., Resende, J. T. V. & Takahashi, L. S. A. (2021). Nutritional quality and technological potential of pitaya species. *Semina. Ciências Agrárias*, 42(3Supl1), 2023–2030. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n3supl1p2023>

- Damodaran, S., Parkin, K. L. & Fennema, O. R. (2010). *Minerais. Quimica de Alimentos de Fennema*, Artmed Editora. ISBN-10: 8536322489.
- Dankwa, R., Aisala, H., Kayitesi, E., & de Kock, H. L. (2021). The sensory profiles of flatbreads made from sorghum, cassava, and Cowpea flour used as wheat flour alternatives. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/foods10123095>
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains--characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3), 173–289. <https://doi.org/10.1080/10408690091189257>
- Dong, J., Jiang, W., Gao, P., Yang, T., Zhang, W., Huangfu, M., Zhang, J., & Che, D. (2023). Comparison of betalain compounds in two Beta vulgaris var. cicla and BvCYP76AD27 function identification in betalain biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 199, 107711. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107711>
- Du, S.-K., Jiang, H., Yu, X., & Jane, J.-L. (2014). Physicochemical and functional properties of whole legume flour. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 55(1), 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.001>
- EFSA. (2021, May 6). Titanium dioxide: E171 no longer considered safe when used as a food additive | EFSA. [www.efsa.europa.eu. https://www.efsa.europa.eu/en/news/titanium-dioxide-e171-no-longer-considered-safe-when-used-food-additive](https://www.efsa.europa.eu/en/news/titanium-dioxide-e171-no-longer-considered-safe-when-used-food-additive)
- Escribano, J., Cabanes, J., Jiménez-Atiénzar, M., Ibañez-Tremolada, M., Gómez-Pando, L. R., García-Carmona, F., & Gandía-Herrero, F. (2017). Characterization of betalains, saponins and antioxidant power in differently colored quinoa (Chenopodium quinoa) varieties. *Food Chemistry*, 234, 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.187>
- Fabbri, A. D. T., & Crosby, G. A. (2016). A review of the impact of preparation and cooking on the nutritional quality of vegetables and legumes. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 3, 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2015.11.001>

- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2016). *Pulses: Nutritious Seeds for a Sustainable Future*. Food & Agriculture Organization of the United Nations.
- Faridah, A., Holinesti, R., & Syukri, D. (2015). Betalains from Red Pitaya Peel (*Hylocereus polyrhizus*): Extraction, Spectrophotometric and HPLC-DAD Identification, Bioactivity and Toxicity Screening. *Pakistan journal of nutrition : PJN*, *14*(12), 976–982. <https://doi.org/10.3923/pjn.2015.976.982>
- Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. (2010). *FAO Food and Nutrition Paper*, *91*, 1–166.
- Ferawati, F., Hefni, M., Östbring, K., & Witthöft, C. (2021). The application of pulse flours in the development of plant-based cheese analogues: Proximate composition, color, and texture properties. *Foods (Basel, Switzerland)*, *10*(9). <https://doi.org/10.3390/foods10092208>
- Ferreira, V. C., Ampese, L. C., Sganzerla, W. G., Colpini, L. M. S., & Forster-Carneiro, T. (2023). An updated review of recent applications and future perspectives on the sustainable valorization of pitaya (*Hylocereus* spp.) by-products. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, *33*(101070), 101070. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101070>
- Freitas, M. S. (2013). corante artificial amarelo tartrazina: uma revisão das propriedades e análises de quantificação. *Acta Tecnológica*, *7*(2), 65–72. <https://doi.org/10.35818/acta.v7i2.90>
- Gandía-Herrero, F., & García-Carmona, F. (2013). Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends in Plant Science*, *18*(6), 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.01.003>
- Gbenga-Fabusiwa, F. J., Oladele, E. P., Oboh, G., Adefegha, S. A., Fabusiwa, O. F., Osho, P. O., Enikuomihin, A., & Oshodi, A. A. (2019). Glycemic response in diabetic subjects to biscuits produced from blends of pigeon pea and wheat flour. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, *74*(4), 553–559. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00758-2>

- Ghosh, S., Sarkar, T., Das, A., & Chakraborty, R. (2022). Natural colorants from plant pigments and their encapsulation: An emerging window for the food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, *153*(112527), 112527. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112527>
- Gisslen, W. (2015). *Panificação e Confeitaria Profissionais* (5<sup>a</sup> ed.). Editora Manole. ISBN-10: 8520428509.
- He, Y., Meda, V., Reaney, M. J. T., & Mustafa, R. (2021). Aquafaba, a new plant-based rheological additive for food applications. *Trends in Food Science & Technology*, *111*, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.035>
- Hedayati, S., & Mazaheri Tehrani, M. (2018). Effect of total replacement of egg by soymilk and lecithin on physical properties of batter and cake. *Food Science & Nutrition*, *6*(4), 1154–1161. <https://doi.org/10.1002/fsn3.656>
- Ho, C. S., Lam, C. W. K., Chan, M. H. M., Cheung, R. C. K., Law, L. K., Lit, L. C. W., Ng, K. F., Suen, M. W. M., & Tai, H. L. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist. Reviews*, *24*(1), 3–12.
- Honorato, T. C., Silva, E. B. da, Pereira, T. P., & Nascimento, K. de O. do. (2013). Food additives: applications and toxicology. *Revista Verde De Agroecologia E Desenvolvimento Sustentável*, *8*(5), 01–11. <https://doi.org/10.18378/rvads.v8i5.1950>
- Huang, Y., Brennan, M. A., Kasapis, S., Richardson, S. J., & Brennan, C. S. (2021). Maturation process, nutritional profile, bioactivities and utilisation in food products of red pitaya fruits: A review. *Foods (Basel, Switzerland)*, *10*(11). <https://doi.org/10.3390/foods10112862>
- International Organization for Standardization. (2003). *Microbiology of food and animal feedings stuffs – Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions* (ISO 15213).
- International Organization for Standardization. (2006). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique* (ISO 4832).

- International Organization for Standardization. (2008). *Sensory Analysis—Vocabulary* (ISO 5492:2008).
- International Organization for Standardization. (2013). *Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 2: Colony count at 30 °C by the surface plating technique* (ISO 4833-2).
- Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. *Interpretação dos resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de produção e distribuição alimentar: valores-guia*. Repositório Científico do Instituto Nacional de Saúde. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5610>
- Jerônimo, M. C., & Costa Orsine, J. V. (2015). Chemical and physical-chemical properties, antioxidant activity and fatty acids profile of red pitaya [*Hylocereus undatus* (haw.) Britton & Rose] grown in Brazil. *Journal of drug metabolism & toxicology*, *06*(04), 1–6. <https://doi.org/10.4172/2157-7609.1000188>
- Junqueira, K., Junqueira, N., Ramos, J., & Pereira, A. (2002). *Informações preliminares sobre uma espécie de pitaya do cerrado*. Planaltina: Embrapa Cerrados. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/566991>
- Kan, L., Nie, S., Hu, J., Wang, S., Bai, Z., Wang, J., Zhou, Y., Jiang, J., Zeng, Q., & Song, K. (2018). Comparative study on the chemical composition, anthocyanins, tocopherols and carotenoids of selected legumes. *Food Chemistry*, *260*, 317–326. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.148>
- Khan, M. I. (2016a). Plant betalains: Safety, antioxidant activity, clinical efficacy, and bioavailability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *15*(2), 316–330. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12185>
- Khan, M. I. (2016b). Stabilization of betalains: A review. *Food Chemistry*, *197*, 1280–1285. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.043>
- Khrisanapant, P., Kebede, B., Leong, S. Y., & Oey, I. (2019). A comprehensive characterisation of volatile and fatty acid profiles of legume seeds. *Foods (Basel, Switzerland)*, *8*(12). <https://doi.org/10.3390/foods8120651>
- Krause, S., Keller, S., Hashemi, A., Descharles, N., Bonazzi, C., & Rega, B. (2022). From flours to cakes: Reactivity potential of pulse ingredients to generate volatile

- compounds impacting the quality of processed foods. *Food Chemistry*, 371(131379), 131379. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131379>
- Lafarga, T., Villaró, S., Bobo, G., & Aguiló-Aguayo, I. (2019). Optimisation of the pH and boiling conditions needed to obtain improved foaming and emulsifying properties of chickpea aquafaba using a response surface methodology. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 18(100177), 100177. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2019.100177>
- Lin, L., & Xu, J. (2020). Fungal pigments and their roles associated with human health. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 6(4). <https://doi.org/10.3390/jof6040280>
- Luiza Koop, B., Nascimento da Silva, M., Diniz da Silva, F., Thayres dos Santos Lima, K., Santos Soares, L., José de Andrade, C., Ayala Valencia, G., & Rodrigues Monteiro, A. (2022). Flavonoids, anthocyanins, betalains, curcumin, and carotenoids: Sources, classification and enhanced stabilization by encapsulation and adsorption. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 153(110929), 110929. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110929>
- Malamisura, M., Colantuono, R., Salvati, V. M., Croce, R., D'Adamo, G., Passaro, T., D'Angelo, E., Boffardi, M., Garzi, A., & Malamisura, B. (2019). Current espghan guidelines for celiac disease in pediatric age, tertiary care Center experience: A proposal for further simplification. *Translational Medicine @ UniSa*, 20, 13–18.
- Martins, I. R., Martins, L. H. da S., Chisté, R. C., Picone, C. S. F., & Joele, M. R. S. P. (2024). Betalains from vegetable peels: Extraction methods, stability, and applications as natural food colorants. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 195(114956), 114956. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114956>
- Moussa-Ayoub, T. E., Jaeger, H., Knorr, D., El-Samahy, S., Rohn, S., & Kroh, L. W. (2011). Impact of traditional and innovative technologies on some characteristics and bioactive compounds of *Opuntia macrorhiza* juice. *Procedia Food Science*, 1, 1410–1416. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.209>
- Muthukumar, J., Selvasekaran, P., Lokanadham, M., & Chidambaram, R. (2020). Food and food products associated with food allergy and food intolerance – An

overview. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 138(109780), 109780.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109780>

- Nerd, A., Gutman, F., & Mizrahi, Y. (1999). Ripening and postharvest behaviour of fruits of two *Hylocereus* species (Cactaceae). *Postharvest Biology and Technology*, 17(1), 39–45. [https://doi.org/10.1016/s0925-5214\(99\)00035-6](https://doi.org/10.1016/s0925-5214(99)00035-6)
- Nguyen, T. M. N., Nguyen, T. P., Tran, G. B., & Le, P. T. Q. (2020). Effect of processing methods on foam properties and application of lima bean (*Phaseolus lunatus*L.) aquafaba in eggless cupcakes. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(11). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14886>
- Njapndounke, B., Ngouénam, R. J., Kouam, E. M. F., Boungo, G. T., Klang, J. M., & Ngoufack, F. Z. (2023). Mixture design approach for the development of a cowpea and banane cochon flour-based gluten-free biscuit: Chemical, glycemic load, sensory and microbiological characteristics of the optimal biscuit. *Future Foods: A Dedicated Journal for Sustainability in Food Science*, 8(100264), 100264. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2023.100264>
- Nunes, E. N., de Sousa, A. S. B., de Lucena, C. M., Silva, S. de M., de Lucena, R. F. P., Alves, C. A. B., & Alves, R. E. (2014). Pitaia (*Hylocereus* sp.): Uma revisão para o Brasil. *Gaia Scientia*, 8(1). Recuperado de <https://periodicos.ufpb.br/ojs2/index.php/gaia/article/view/18397>
- Nurul, S. R., & Asmah, R. (2014). Variability in nutritional composition and phytochemical properties of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) from Malaysia and Australia. *International Food Research Journal*, 21(4).
- Otálora, M. C., Carriazo, J. G., Iturriaga, L., Osorio, C., & Nazareno, M. A. (2016). Encapsulating betalains from *Opuntia ficus-indica* fruits by ionic gelation: Pigment chemical stability during storage of beads. *Food Chemistry*, 202, 373–382. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.115>
- Otálora, M. C., Carriazo, J. G., Osorio, C., & Nazareno, M. A. (2018). Encapsulation of cactus (*Opuntia megacantha*) betaxanthins by ionic gelation and spray drying: A comparative study. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 111, 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.058>

- Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. (2008). *Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo aos aditivos alimentares (Texto relevante para efeitos do EEE)*. Jornal Oficial da União Europeia.
- Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. (2011). *Texto consolidado: Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de outubro de 2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) n.º 1924/2006 e (CE) n.º 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho e revoga as Diretivas 87/250/CEE da Comissão, 90/496/CEE do Conselho, 1999/10/CE da Comissão, 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, 2002/67/CE e 2008/5/CE da Comissão e o Regulamento (CE) n.º 608/2004 da Comissão (Texto relevante para efeitos do EEE)*. Jornal Oficial da União Europeia.
- Pereira, A. C. da S., Moura, S. M., & Constant, P. B. L. (2008). Alergia alimentar: sistema imunológico e principais alimentos envolvidos. *Semina: Ciências Biológicas E Da Saúde*, 29(2), 189–200. <https://doi.org/10.5433/1679-0367.2008v29n2p189>
- Ribeiro, J. S., & Veloso, C. M. (2021). Microencapsulation of natural dyes with biopolymers for application in food: A review. *Food Hydrocolloids*, 112(106374), 106374. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106374>
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2016). Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science*, 7, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.08.004>
- Roriz, C. L., Barros, L., Prieto, M. A., Ćirić, A., Soković, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Enhancing the antimicrobial and antifungal activities of a coloring extract agent rich in betacyanins obtained from *Gomphrena globosa* L. flowers. *Food & Function*, 9(12), 6205–6217. <https://doi.org/10.1039/c8fo01829d>
- Roriz, C. L., Barros, L., Prieto, M. A., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Floral parts of *Gomphrena globosa* L. as a novel alternative source of betacyanins: Optimization of the extraction using response surface methodology. *Food Chemistry*, 229, 223–234. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.073>

- Roriz, C. L., Heleno, S. A., Alves, M. J., Oliveira, M. B. P. P., Pinela, J., Dias, M. I., Calhelha, R. C., Morales, P., Ferreira, I. C. F. R., & Barros, L. (2022). Red pitaya (*Hylocereus costaricensis*) peel as a source of valuable molecules: Extraction optimization to recover natural colouring agents. *Food Chemistry*, *372*(131344), 131344. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131344>
- Roriz, C. L., Heleno, S. A., Carocho, M., Rodrigues, P., Pinela, J., Dias, M. I., Fernandes, I. P., Barreiro, M. F., Morales, P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2020). Betacyanins from *Gomphrena globosa* L. flowers: Incorporation in cookies as natural colouring agents. *Food Chemistry*, *329*(127178), 127178. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127178>
- Roriz, C. L., Xavier, V., Heleno, S. A., Pinela, J., Dias, M. I., Calhelha, R. C., Morales, P., Ferreira, I. C. F. R., & Barros, L. (2021). Chemical and bioactive features of *Amaranthus caudatus* L. flowers and optimized ultrasound-assisted extraction of betalains. *Foods* (Basel, Switzerland), *10*(4). <https://doi.org/10.3390/foods10040779>
- Sadowska-Bartosz, I., & Bartosz, G. (2021). Biological properties and applications of betalains. *Molecules* (Basel, Switzerland), *26*(9). <https://doi.org/10.3390/molecules26092520>
- Santos, D. N. d., Pio, L. A. S., & Faleiro, F. G. (2022). *Pitaya: uma alternativa frutífera*. DF: ProImpress. ISBN: 978-65-991179-1-6.
- Sarker, U., Lin, Y.-P., Oba, S., Yoshioka, Y., & Hoshikawa, K. (2022). Prospects and potentials of underutilized leafy Amaranths as vegetable use for health-promotion. *Plant Physiology and Biochemistry*, *182*, 104–123. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.04.011>
- Scherf, K. A. (2019). Immunoreactive cereal proteins in wheat allergy, non-celiac gluten/wheat sensitivity (NCGS) and celiac disease. *Current Opinion in Food Science*, *25*, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.02.003>
- Silva, T. S. da G. e., & Furlanetto, T. W. (2010). Diagnóstico de doença celíaca em adultos. *Revista Da Associacao Medica Brasileira* (1992), *56*(1), 122–126. <https://doi.org/10.1590/s0104-42302010000100027>

- Soupeze, J.-B. R. G., Dages, B. A. S., Pavar, G. S., Fabian, J., Thomas, J. M., & Theodosiou, E. (2025). Mechanical properties and texture profile analysis of beef burgers and plant-based analogues. *Journal of Food Engineering*, 385(112259), 112259. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2024.112259>
- Szilagy, A., & Ishayek, N. (2018). Lactose intolerance, dairy avoidance, and treatment options. *Nutrients*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/nu10121994>
- Tabio-García, D., Paraguay-Delgado, F., Sánchez-Madrigal, M. Á., Quintero-Ramos, A., Espinoza-Hicks, J. C., Meléndez-Pizarro, C. O., Ruiz-Gutiérrez, M. G., & Espitia-Rangel, E. (2021). Optimisation of the ultrasound-assisted extraction of betalains and polyphenols from *Amaranthus hypochondriacus* var. Nutrisol. *Ultrasonics Sonochemistry*, 77(105680), 105680. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105680>
- TBCA. Tabela Brasileira e Composição de Alimentos. Pitaia, in natura, Brasil, *Hylocereus undatus* (Pitaya, raw, Brazil) .[https://www.tbca.net.br/base-dados/int\\_composicao\\_alimentos.php?cod\\_produto=BRC0225C](https://www.tbca.net.br/base-dados/int_composicao_alimentos.php?cod_produto=BRC0225C)
- Thaiudom, S., Oonsivilai, R., & Thaiwong, N. (2021). Production of colorant powder from dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peel: Bioactivity, heavy metal contamination, antimutagenicity, and antioxidation aspects. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(1). <https://doi.org/10.1111/jfpp.15044>
- Turkut, G. M., Cakmak, H., Kumcuoglu, S., & Tavman, S. (2016). Effect of quinoa flour on gluten-free bread batter rheology and bread quality. *Journal of Cereal Science*, 69, 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.03.005>
- Tutone, M., Virzì, A., & Almerico, A. M. (2018). Reverse screening on indicaxanthin from *Opuntia ficus-indica* as natural chemoactive and chemopreventive agent. *Journal of Theoretical Biology*, 455, 147–160. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2018.07.017>
- USDA. United States Department of Agriculture. *Wheat Explorer*. International Production Assessment Division (IPAD) - Home Page. [https://ipad.fas.usda.gov/cropexplorer/cropview/commodityView.aspx?cropid=0410000&sel\\_year=2022&rankby=Production](https://ipad.fas.usda.gov/cropexplorer/cropview/commodityView.aspx?cropid=0410000&sel_year=2022&rankby=Production)

- USDA. United States Department of Agriculture. *FoodData Central*. FoodData Central. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/2344729/nutrients>
- Vandenplas, Y., Meyer, R. M., & Huysentruyt, K. (2024). Food allergy: Prevention and treatment of Cow's milk allergy. *Clinical Nutrition ESPEN*, *59*, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2023.11.007>
- Villa-Jaimes, G. S., Aguilar-Mora, F. A., González-Ponce, H. A., Avelar-González, F. J., Martínez Saldaña, M. C., Buist-Homan, M., & Moshage, H. (2022). Biocomponents from *Opuntia robusta* and *Opuntia streptacantha* fruits protect against diclofenac-induced acute liver damage in vivo and in vitro. *Journal of Functional Foods*, *89*(104960), 104960. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.104960>
- Wei, W., Cheng, M.-N., Ba, L.-J., Zeng, R.-X., Luo, D.-L., Qin, Y.-H., Liu, Z.-L., Kuang, J.-F., Lu, W.-J., Chen, J.-Y., Su, X.-G., & Shan, W. (2019). Pitaya HpWRKY3 is associated with fruit sugar accumulation by transcriptionally modulating sucrose metabolic genes HpINV2 and HpSuSy1. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(8). <https://doi.org/10.3390/ijms20081890>
- Wijesinghe, V. N., & Choo, W. S. (2022). Antimicrobial betalains. *Journal of Applied Microbiology*, *133*(6), 3347–3367. <https://doi.org/10.1111/jam.15798>
- Xu, J., Zhang, Y., Wang, W., & Li, Y. (2020). Advanced properties of gluten-free cookies, cakes, and crackers: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *103*, 200–213. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.017>
- Xu, X., Jiang, Y., Yeo, Q. X., & Zhou, W. (2024). Purification and characterization of betacyanin monomers from *Hylocereus polyrhizus* peel: A comparative study of their antioxidant and antidiabetic activities with mechanistic insights. *Food Chemistry*, *451*, 139467. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139467>
- Yazici, G. N., & Ozer, M. S. (2021). A review of egg replacement in cake production: Effects on batter and cake properties. *Trends in Food Science & Technology*, *111*, 346–359. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.071>
- Yu, T., Jing, S., Jiabin, L., Aixia, W., Mengzi, N., Xue, G., Lili, W., Liya, L., Fengzhong, W., & Litao, T. (2024). Effects of milling methods on rice flour properties and

rice product quality: A review. *Rice Science*, 31(1), 33–46.  
<https://doi.org/10.1016/j.rsci.2023.11.002>

Zhang, L., Liu, X., Li, J., Meng, Y., & Zhao, G.-R. (2023). Improvement of betanin biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 8(1), 54–60.  
<https://doi.org/10.1016/j.synbio.2022.11.002>