



Ana Rita Pinheiro Pacheco

**Análise nutricional, físico-química e atividade
antioxidante de frutos de *Quercus sp.*
visando a sua valorização**

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em
Controlo da Qualidade
Especialidade em Água e Alimentos

Trabalho desenvolvido sobre a orientação de:

**Doutora Ana Cristina Mendes Ferreira da Vinha
Doutora Maria Beatriz Prior Pinto de Oliveira**

Outubro, 2015

De acordo com a legislação em vigor, não é permitida a reprodução de qualquer parte desta Dissertação/Tese.



Este trabalho foi financiado pela União Europeia (fundos FEDER através do COMPETE) e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), através do projeto Pest-C/EQB/LA0006/2013. Contou também com o apoio financeiro da União Europeia (fundos FEDER), no âmbito do QREN, através do Projeto NORTE-07-0124-FEDER-000069.

Agradecimentos

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração e estímulo de diversas pessoas, o que deste modo me leva a expressar a minha gratidão a todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a realização desta dissertação.

Assim, quero manifestar o meu agradecimento às orientadoras, Prof. Doutora Ana Cristina Mendes Ferreira da Vinha e Prof. Doutora Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira pela oportunidade, disponibilidade e paciência e também por todo o apoio científico para desenvolver este projecto.

A todos os colegas do serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pelo apoio científico e moral durante a execução deste projecto, em especial à Mestre Anabela Costa, por todo o acompanhamento, paciência e passagem de conhecimento que sem dúvida facilitou e enriqueceu o desenvolvimento de toda a dissertação.

À minha família e aos meus amigos, por todo apoio, motivação e compreensão durante este percurso.

A todos um muito obrigado por terem estado comigo nesta árdua e enriquecedora experiência.

Resumo

As espécies *Quercus* representam uma vasta área da floresta nacional, embora até à data os seus frutos ainda sejam pouco valorizados. A utilização dos seus frutos, bem como os seus subprodutos pode conduzir a novos ingredientes com propriedades biológicas interessantes, visando a sua utilização em várias indústrias, nomeadamente alimentar, cosmética e farmacêutica. Neste estudo, foi avaliada a composição nutricional, e antioxidante do miolo, da casca e do fruto inteiro de quatro espécies de *Quercus* portuguesas (*Q. suber*, *Q. faginea*, *Q. nigra* e *Q. ilex*).

Na caracterização nutricional, foram analisados os teores de humidade, cinzas, proteína, gordura e hidratos de carbono por métodos AOAC. O perfil de ácidos gordos e da vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis) foram determinados por técnicas cromatográficas, GC-FID e HPLC-FLD, respetivamente.

Os teores de proteína variaram entre 2,2 e 9,7 g/100 g sendo que a espécie com teor mais elevado é a espécie *Q. suber*. O teor de gordura nunca excedeu os 4 g/100g e nas cascas foi inferior a 1 g/100 g, porém a espécie *Q. ilex* apresenta teores de gordura elevados quando comparada com as outras espécies (12,01 g/100g no miolo, 1,07 g/100g na casca e 10,23 g/100g no fruto inteiro). Os hidratos de carbono, que incluem a fibra dietética, variaram entre 84,3 e 95,6 g/100g. O perfil de ácidos gordos é muito semelhante em todas as espécies. Em relação à vitamina E, no miolo destaca-se a espécie *Q. nigra* e em relação à casca a espécie *Q. faginea*.

A atividade antioxidante das amostras foi determinada pelos ensaios DPPH^{*} e FRAP. Foram ainda determinados os teores de compostos fenólicos totais, clorofilas e carotenoides, nas mesmas amostras. Todas as amostras demonstraram elevado potencial antioxidante, no entanto, em relação à casca destacou-se a espécie *Q. nigra* (CFT: 41,48 mg EAG/g extrato seco; DPPH: 73,59%; FRAP: 841,25 µmol/g extrato seco) porém, em relação ao miolo os resultados diferem em todos os ensaios, destacando-se a espécie *Q. faginea* nos compostos fenólicos totais (38,25 mg EAG/g), a espécie *Q. suber* no ensaio DPPH^{*} (79,64%) e a espécie *Q. ilex* no ensaio FRAP (1011,25 µmol/g extrato seco).

Os resultados deste estudo comprovam o potencial interesse das bolotas em possíveis aplicações em diversas indústrias, para o desenvolvimento de novos produtos e possível substituição de outros.

Palavras-Chave: *Quercus*, miolo, casca, caracterização nutricional, atividade antioxidante.

Abstract

The *Quercus* species represents a wide area of the national forest although up until now its fruits are undervalued. The usage of its fruits as well as its by products may lead to new ingredients with interesting biological properties which can be used in several industries such as food, cosmetics and pharmaceutical. In this study the nutritional and antioxidant composition of kernel, shell and the whole fruit of four Portuguese *Quercus* species (*Q. suber*, *Q. faginea*, *Q. nigra* e *Q. ilex*) was analysed.

In matters of nutritional characterization moisture, ashes, protein, fat and carbohydrates levels were analysed through AOAC methods. The fat acids and vitamin E (tocopherols and tocotrienols) profile were determined by chromatographic techniques, GC-FID and HPLC-FLD, respectively.

The protein levels fluctuated between 2.2 and 9.7 g/100g, the highest level belonging to the *Q. suber* species. The fat level never exceeded 4g/100g and in the shells was inferior to 1g/100g. However the *Q. ilex* species presents high fat levels when compared to the other species (12.01g/100g in the kernel, 1.07/100g in the shell and 10,23g/100g in the whole fruit). The carbohydrates, which include dietary fibre, fluctuated between 84.3 and 95.6 g/100g. The fat acids profile is very similar in all species. Concerning vitamin E, the *Q. nigra* species and the *Q. faginea* species are more visible in the kernel and in the shell, respectively.

The samples antioxidant activity was determined through DPPH[•] and FRAP assay. Levels of total phenolics, carotenoids and chlorophylls composts were also determined through the same samples. All samples showed high antioxidant potencial although the *Q. nigra* species (CFT: 41,48 mg EAG /g dry extract; DPPH: 73,59%; FRAP: 841,25 µmol/g dry extract) stands out in the shell levels. Concerning the kernel, results differ in all assays: the *Q. faginea* stands out in the total phenolics (38,25 mg EAG /g); the *Q. suber* in the DPPH[•] assay (79,64%) and the *Q. ilex* in the FRAP assay (1011,25 µmol/g dry extract).

The findings of this study prove the potential interest of acorns in a wide range of possible applications in multiple and diverse industries leading to the development of new products and opening doors to the substitution of others.

Keywords: *Quercus*, kernel, Shell, nutritional characterization, antioxidant activity.

Publicações e comunicações

Comunicações em forma de Poster:

1. **R. Pacheco**, A.F. Vinha, M.B.P.P. Oliveira. Acorn as a food resource. 7^o Encontro da Investigação Jovem da Universidade do Porto (IJUP), Fevereiro 2014, Porto, Portugal.
2. **R. Pacheco**, A.F. Vinha, M.B.P.P. Oliveira, Portuguese autochthonous acorn species. A new concept of sustainability for the development of new food products, XX Encontro Luso-Galego de Química, Novembro 2014, Porto, Portugal.
3. **R. Pacheco**, A.S.G. Costa, A.F. Vinha, M.B.P.P. Oliveira, Portuguese autochthonous acorn species: nutritional analysis, 106th AOCS Annual Meeting and Industry Showcases, Maio 2015, Orlando, Florida, USA.
4. **R. Pacheco**, A.S.G. Costa, F. Pimentel, A.F. Vinha, M.B.P.P. Oliveira, Nutritional value and fatty acid profile from acorns (*Quercus nigra*): intending new alternative applications, 8^o Encontro da Investigação Jovem da Universidade do Porto (IJUP), Maio 2015, Porto, Portugal.
5. **R. Pacheco**, A.S.G. Costa, A.F. Vinha, M.B.P.P. Oliveira, *Quercus suber* fruits: characterization of their nutritional value for sustainable applications, XIV Congresso de Nutrição e Alimentação, Maio 2015, Lisboa, Portugal.

Artigo submetido:

1. **R. Pacheco**, A.F. Vinha, A.S.G. Costa, M. Beatriz P.P. Oliveira, Nutritional and phytochemical composition of *Quercus* fruits: a review, Waste Management, submitted.

Índice

Agradecimentos	IV
Resumo.....	V
Abstract.....	VI
Publicações e comunicações	VII
Índice	VIII
Lista de Figuras.....	XI
Lista de Tabelas.....	XII
Lista de Abreviaturas.....	XIII
1. Introdução	1
1.1 Frutos do género <i>Quercus</i>	2
1.1.1 Composição da bolota.....	2
1.2 Sustentabilidade e segurança alimentar	4
1.3 Composição química	5
1.3.1 Óleo de bolota.....	8
1.3.2 Farinha de bolota	8
1.4 Toxicidade	10
1.5 Compostos fitoquímicos.....	10
1.6 Atividades biológicas	12
1.6.1 Atividade antioxidante	12
1.6.2 Atividade antimicrobiana	13
1.6.3 Outras atividades biológicas.....	14
1.7 Objetivos.....	15

1.7.1 Objetivo geral	15
1.7.1 Objetivos específicos.....	15
2. Material e Métodos.....	16
2.1 Reagentes e padrões.....	17
2.2 Recolha e tratamento das amostras	18
2.3 Análise morfológica.....	19
2.4 Análise centesimal.....	19
2.4.1 Determinação do teor de humidade.....	19
2.4.2 Determinação do teor de cinzas	19
2.4.3 Determinação do teor de proteína	20
2.4.4 Determinação do teor de gordura total	20
2.4.5 Determinação do teor de hidratos de carbono.....	21
2.5 Determinação da composição em ácidos gordos.....	21
2.5.1 Derivatização	21
2.5.2 Análise cromatográfica.....	21
2.6 Determinação do teor de vitamina E	22
2.6.1 Preparação das amostras	22
2.6.2 Análise cromatográfica.....	23
2.7 Determinação do teor de clorofilas e carotenoides.....	23
2.8 Compostos bioativos e atividade antioxidante.....	24
2.8.1 Preparação dos extratos	24
2.8.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	24
2.8.3 Determinação da capacidade antioxidante	25

2.8.3.1 DPPH*	25
2.8.3.2 FRAP.....	26
3. Resultados e Discussão	27
3.1. Análise morfológica.....	28
3.2 Análise química	29
3.2.1 Caracterização do perfil nutricional.....	29
3.2.2 Ácidos gordos.....	33
3.2.3 Vitamina E.....	39
3.3 Compostos bioativos e atividade antioxidante.....	41
3.3.1 Determinação do teor de clorofilas e carotenoides	41
3.3.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	43
3.3.3 Determinação da atividade antioxidante.....	44
3.4 Correlação entre os compostos bioativos e a atividade antioxidante.	46
4. Conclusão	48
4.1 Perspetivas de trabalho futuro	49
5. Referências bibliográficas	50

Lista de Figuras

Figura 1 – Espécies de <i>Quercus</i> identificadas em Portugal.....	2
Figura 2 – Constituição morfológica dos frutos do género <i>Quercus</i>	3
Figura 3 – Amostras trituradas e homogeneizadas para posterior análise.....	18
Figura 4 – Morfologia das amostras estudadas.	19
Figura 5 – Curva de calibração do ácido gálgico (mg/L).....	25
Figura 6 – Curva de calibração do sulfato ferroso (mg/L).	26
Figura 7 – Características morfológicas das espécies de <i>Quercus</i> estudadas.	28
Figura 8 – Cromatogramas da análise de FAME do fruto inteiro das espécies de <i>Quercus</i> estudadas.	35
Figura 9 – Cromatogramas da análise de FAME do miolo e da casca das espécies de <i>Quercus</i> estudadas.	38
Figura 10 – Correlação entre as clorofilas (mg/g) e os carotenoides (mg/g).....	47
Figura 11 – Correlação entre os compostos fenólicos totais (mg EAG/g) e a % de inibição do radical DPPH.....	47
Figura 12 – Correlação entre os compostos fenólicos totais (mg EAG/g) e o FRAP ($\mu\text{mol/g}$ extrato seco).	47

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Valores nutricionais do fruto inteiro das espécies de <i>Quercus</i> estudadas.....	29
Tabela 2 – Valores nutricionais do miolo e da casca das espécies de <i>Quercus</i> estudadas.	31
Tabela 3 – Composição em ácidos gordos do fruto inteiro das espécies de <i>Quercus</i> estudadas.	34
Tabela 4 – Composição em ácidos gordos do miolo e da casca das espécies de <i>Quercus</i> estudadas.	36
Tabela 5 – Valor total de vitamina E e dos diferentes vitâmeros do fruto inteiro das espécies de <i>Quercus</i> estudadas.	39
Tabela 6 – Valor total de vitamina E e dos diferentes vitâmeros do miolo e da casca das espécies de <i>Quercus</i> estudadas.	40
Tabela 7 – Valores dos pigmentos presentes no fruto inteiro das espécies de <i>Quercus</i> estudadas.	41
Tabela 8 – Valores dos pigmentos presentes no miolo e na casca das espécies de <i>Quercus</i> estudadas.	42
Tabela 9 – Teor de fenólicos totais das espécies de <i>Quercus</i> estudadas.....	43
Tabela 10 – Resultados das atividades antioxidantes das espécies de <i>Quercus</i> estudadas..	45

Lista de Abreviaturas

BHT – hidroxitolueno butilado

CFT – compostos fenólicos totais

DPPH – radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

EAG – equivalentes de ácido gálgico

ERO – espécies reativas de oxigénio

ESF – equivalentes de sulfato ferroso

FAME – ésteres metílicos dos ácidos gordos (do inglês *fatty acid methyl esters*)

FRAP – capacidade antioxidante de redução do ferro (do inglês *ferric reducing ability of plasma*)

GC-FID – cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama (do inglês *gas chromatography with flame ionization detector*)

HDL – lipoproteína de alta densidade (do inglês *high density lipoprotein*)

HPLC-FLD – cromatografia líquida de alta performance com deteção por fluorescência (do inglês *high performance liquid chromatography with fluorescence detection*)

LDL – lipoproteína de baixa densidade (do inglês *low density lipoprotein*)

MUFA – ácidos gordos monoinsaturados (do inglês *monounsaturated fatty acids*)

PI – padrão interno

PUFA – ácidos gordos polinsaturados (do inglês *polyunsaturated fatty acids*)

RFC – reagente de Folin-Ciocalteu

SFA – ácidos gordos saturados (do inglês *saturated fatty acids*)

TPTZ – solução tripiridiltriazina

UV - ultravioleta

1. Introdução

1.1 Frutos do género *Quercus*

O género *Quercus* pertence à família *Fagaceae*, um importante grupo de árvores de folha caduca ou persistente, predominantes em climas tropicais ou temperados. Esta família inclui cerca de 450 espécies a nível mundial (Sánchez-Burgos et al., 2013), sendo a bolota o fruto destas árvores. Portugal tem uma grande área de carvalhos que são utilizados com diversos fins mas os seus frutos são pouco valorizados. Atualmente, uma pequena percentagem é usada em alimentação animal. No entanto, as bolotas já foram consideradas como um alimento de primeira necessidade na Europa, Ásia, Norte de África, Médio-Oriente e Norte da América (Bainbridge, 2001).

Em Portugal foram identificadas oito espécies: *Quercus. suber*, *Q. faginea*, *Q. pyrenaica/nigra*, *Q. ilex/rotundifolia*, *Q. robur*, *Q. canariensis*, *Q. coccifera*, *Q. lusitanica* (Figura 1) (Ferreira-Dias et al., 2003).

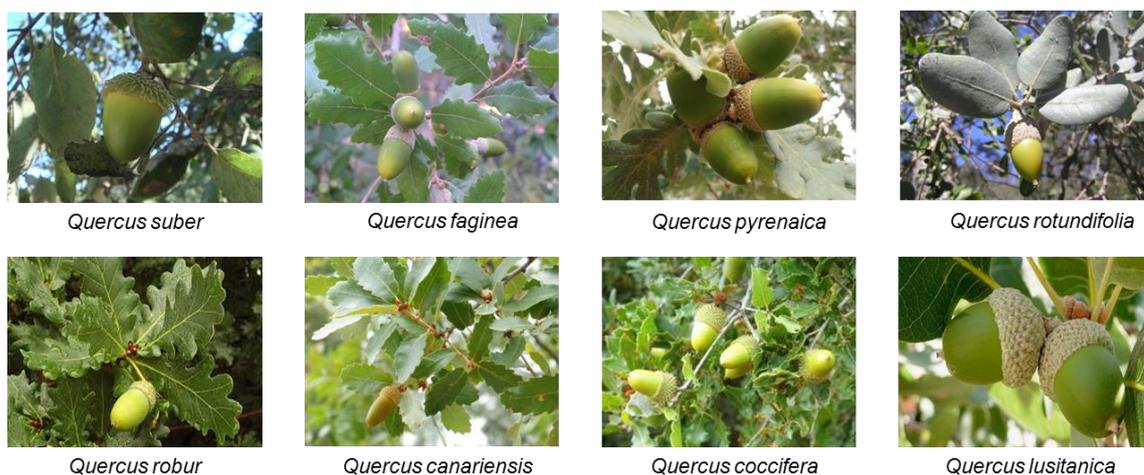


Figura 1 – Espécies de *Quercus* identificadas em Portugal.

As espécies do género *Quercus* ocupam uma área, em Portugal, de aproximadamente 1 200 000 ha. Segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE), o Alentejo representa 80% da quota nacional (INE, 2013).

1.1.1 Composição da bolota

A bolota ou glande é constituída pelo pericarpo (casca) que é a capa externa lignificada que protege a semente, a parte mais interna (Figura 2). Por sua vez a semente é composta pela testa, uma espécie de membrana aveludada e pelo embrião (Watson e Dallwitz, 2000) onde se acumulam as reservas energéticas (Ramos, 2002).

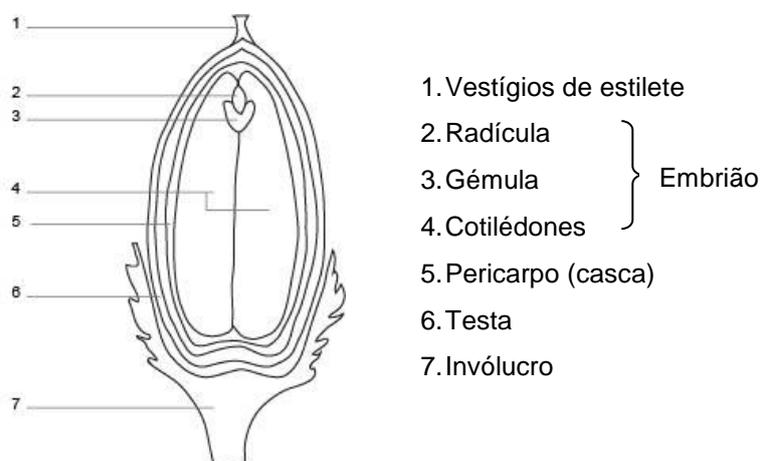


Figura 2 – Constituição morfológica dos frutos do género *Quercus*.

O tamanho da semente é um parâmetro da maior importância ecológica, quer para o estabelecimento da planta numa determinada área geográfica, quer para a propagação da espécie (Garrido et al., 2005). Por outro lado, alguns estudos relacionam a morfometria (tamanho e forma) da bolota com as condições edafo-climáticas (Galván et al., 2012; Garrido et al., 2005; Pritchard et al., 2004). O tamanho das bolotas maduras depende, normalmente, do número de sementes e dos recursos disponíveis.

O consumo de bolotas, especialmente como farinha, remonta ao século XIV (Rakić et al., 2007; 2006), embora, atualmente, o seu principal destino seja a alimentação de suínos. Por tratar-se de um fruto seco, botanicamente descrito como fruto de casca rija, tem níveis consideráveis de lípidos. Assim, o consumo de bolotas pode ocorrer *in natura*, em farinha ou óleo.

A composição química da bolota inclui hidratos de carbono, lípidos, proteínas e aminoácidos (Lopes e Bernardo-Gil, 2005; León-Camacho et al., 2004), resultantes do metabolismo primário do fruto. Incluem-se ainda substâncias de reserva e metabolitos secundários (Rakić et al., 2007; Bainbridge, 2001; Bettinger et al., 1997).

Apesar de estarem descritas diferenças nos teores de fitoquímicos entre as espécies, a sua presença é benéfica para a saúde, uma vez que podem intervir na redução/prevenção do risco de doenças cardiovasculares e inflamatórias, diabetes, cancro e infeções microbianas (Ullah e Khan, 2008; Halliwell et al., 2005; Lee et al., 2005; Jiang e Dusting, 2003).

1.2 Sustentabilidade e segurança alimentar

Atingir um desenvolvimento sustentável, isto é, que responda às necessidades das gerações atuais, sem comprometer o futuro das próximas, tornou-se uma prioridade das entidades governamentais (Bond e Morrison-Saunders, 2011; WCED, 1987).

Cerca de 60% dos ecossistemas estão em contínua degradação, incluindo a água, a pureza do ar, a regulação climática local e regional, os quais se encontram sujeitos a ameaças naturais e epidemias (UNEP, 2005). Esta degradação começa a implicar custos que atingem diversas classes sociais, contribuindo para o aumento das desigualdades e promovendo conflitos sociais.

Na conferência Rio +20, realizada em Junho de 2012 no Rio de Janeiro, foi reiterado o compromisso entre vários países, para o apoio ao desenvolvimento sustentável, de forma a assegurar um futuro para o planeta e para as gerações presentes e futuras. A erradicação da pobreza foi definida como o maior desafio mundial e como requisito indispensável para o desenvolvimento sustentável. Economicamente, a utilização de processos sustentáveis deve repercutir-se na redução de custos e no aumento de receita, através do conhecimento aprofundado dos subprodutos reutilizáveis e os seus benefícios para a saúde e segurança dos consumidores (Wognum et al., 2011).

Espera-se que, em 2050, a população mundial atinja cerca de 9 biliões, tornando-se necessário melhorar o conhecimento do sistema alimentar atual. Além disso, impõe-se aumentar o consumo de alimentos silvestres edíveis, muitas vezes subvalorizados, de maneira a que estas novas alternativas consigam dar resposta à tendencial escassez de alimentos (Spiertz, 2010). Esta linha de pensamento tem como objetivo garantir que toda a população tenha acesso a alimentos seguros e nutritivos, produzidos de maneira sustentável e a custos reduzidos (Grunert et al., 2014; Vinceti et al., 2013; Sibbel, 2007).

As mudanças climáticas, o aumento da poluição, a industrialização no setor agrícola, são alguns dos fatores que intervêm diretamente na sustentabilidade (Reisch et al., 2013).

Os alimentos provenientes das florestas, incluindo ervas e produtos naturais recolhidos de árvores contribuem, de diversas maneiras, para melhorar a disponibilidade alimentar, fornecendo géneros alimentícios acessíveis e nutritivos (Jamnadass et al., 2011; Powell et al., 2011). Além disso, as mudanças climáticas, o fim/redução dos recursos fundamentais e o crescimento da população mundial torna essencial

desenvolver e manter a capacidade dos sistemas agrícolas e de produção no fornecimento de alimentos (Sibbel, 2007).

Estes factos levaram ao desenvolvimento de um novo conceito de “disponibilidade alimentar”, definido pela World Summit on Food Security (WSDS) como a possibilidade de toda a população ter acesso a alimentos seguros e nutritivos que satisfaçam as preferências alimentares e a dieta essencial, promovendo uma vida ativa e saudável (Oosterveer et al., 2014; WSDS, 2009). Além disso, nos últimos anos, têm sido realizados muitos estudos no âmbito da valorização de resíduos alimentares. De acordo com Gustavson et al. (2011) cerca de 1,3 mil milhões de toneladas de material comestível são desperdiçados no mundo, o que representa 1/3 da produção mundial de alimentos. Excluindo as perdas de alimentos agrícolas naturais (até 42%), cerca de 38% derivam de alimentos processados e 20% é distribuído ao longo de toda a cadeia alimentar (European Commission, 2008). No entanto, muitos estudos têm demonstrado que os subprodutos alimentares fornecem compostos bioativos, com propriedades biológicas cientificamente comprovadas, que poderão ser integrados em diferentes áreas, tais como a alimentar, a farmacêutica e a cosmética (Braga et al., 2015; Costa et al., 2014). Em relação aos compostos, como proteínas e aminoácidos essenciais, polissacarídeos, fibras, compostos aromáticos e fitoquímicos presentes nos alimentos e nos seus subprodutos, estes poderão ser ingredientes funcionais, farmacologicamente ativos (Baiano, 2014).

Citam-se como exemplos, os estudos realizados por Baiano et al. (2014) que extraíram compostos bioativos de resíduos vegetais sólidos da couve-flor, aipo, chicória e espargos; a otimização da extração de compostos antioxidantes na pele de prata do café, um subproduto da indústria alimentar (sem valor acrescentado) (Costa et al., 2014); extração da fibra dietética da pele de prata do café e o seu efeito sobre a qualidade e tempo de prateleira do pão iraniano Barbari (Sourki et al., 2013); avaliação e aplicação sustentável dos subprodutos da castanha (*Castanea sativa*) (Braga et al., 2015).

1.3 Composição química

As bolotas recomeçaram, atualmente, a ser valorizadas na economia rural, como ração para o gado suíno, bem como na comunidade científica devido à sua composição nutricional e riqueza em compostos fitoquímicos. Os estudos desenvolvidos neste fruto, independentemente da espécie em causa, têm o mesmo objetivo, a sua total integração

na dieta alimentar. Trata-se de uma fonte natural com elevado valor nutricional e riqueza em compostos bioativos, para além de economicamente rentável (Rosenberg, 2008).

A composição química da bolota depende principalmente de aspetos genéticos (espécies) e fisiológicos, como o grau de maturação. Além destes fatores intrínsecos, vários fatores extrínsecos, como a composição do solo, o clima e a origem geográfica interferem na fisiologia das sementes e, conseqüentemente, na composição química da mesma (Tejerina et al., 2011).

Do ponto de vista nutricional, a bolota contém hidratos de carbono, proteínas, aminoácidos e vitaminas (especialmente A e E) (Rosenberg et al., 2008; Gea-Izquierdo et al., 2006). Os hidratos de carbono representam o principal componente nutritivo da bolota, assumindo a principal reserva de energia. O amido é o principal hidrato de carbono, representando cerca de 62% da matéria seca total (Fernández et al., 2005). Também estão descritos açúcares livres, como glucose e sacarose, concentrados essencialmente nas sementes, (Fernández et al., 2005; Almeida et al., 1992). O interesse em recursos naturais ricos em amido tem vindo a aumentar, principalmente para aplicações industriais no futuro. Correia et al. (2013) consideraram as bolotas uma fonte promissora para a indústria alimentar devido à sua consistência associada a um elevado teor de amilose, com características fortes e elásticas, capazes de melhorar as texturas das massas.

A bolota é considerada um alimento não proteico, devido ao seu baixo teor de proteína. Contém cerca de 5%, expresso em matéria seca (Rodríguez-Estévez et al., 2008). Estão descritos teores entre 3,6% e 10,5%, dependendo da espécie (Fernández et al., 2005). Por exemplo, as bolotas da azinheira (*Quercus rotundifolia/ilex*) têm uma percentagem de proteína inferior à descrita no fruto do sobreiro (*Quercus suber*), por exemplo, com valores entre 6,1 e 8,5% (Rodríguez-Estévez et al., 2008).

Na segunda metade do século XX tornou-se notório um aumento de casos de doença celíaca, que segundo a Associação Portuguesa de Celíacos define-se como uma doença auto-imune que ocorre em indivíduos com predisposição genética causada pela permanente sensibilidade ao glúten. Sendo assim, imperativo encontrar fontes alternativas sem glúten para responder às necessidades desses doentes. Uma vez que a bolota é um alimento não proteico, sugere a importância do uso da sua farinha na produção de produtos de padaria para celíacos. Os produtos sem glúten são considerados produtos de baixo valor nutricional. No entanto, o uso da farinha de bolota

na produção destes alimentos pode aumentar significativamente os seus valores nutricionais, adicionando aminoácidos essenciais, vitaminas, macro e microelementos e fibra dietética (Korus et al., 2015; Kasarda, 2013).

O armazenamento de lípidos nas sementes, como reserva de energia, não é tão comum como o dos hidratos de carbono e substâncias azotadas. Contudo, o ácido oleico, palmítico e linoleico estão descritos como os ácidos gordos predominantes na bolota (Tejerina et al., 2011; Gea-Izquierdo et al., 2006).

Os benefícios associados ao consumo de ácidos gordos polinsaturados, *n*-3 e *n*-6 (PUFA) estão relacionados com a modulação do sistema imune, particularmente na redução da ação dos compostos inflamatórios (Barreira et al., 2010; Darlington e Stone, 2001). A ingestão de PUFA pode também diminuir o risco de doenças cardiovasculares, dos níveis séricos de glicose, de lipoproteínas de baixa densidade-colesterol (LDL) e da proteína C-reativa (Livingstone et al., 2013). Além disso, a ingestão de ácidos gordos insaturados ómega-3 está inversamente relacionada com problemas cognitivos, e ajuda na diminuição da pressão arterial sistólica e diastólica (Lie, 2004). Alguns autores ainda realçam que a bolota é um recurso alimentar promissor devido à elevada quantidade de ácido α -linolénico, importante na síntese dos eicosanoides, e da sua ação na regulação dos níveis séricos de triglicéridos e de HDL-colesterol (Karolyi et al., 2007; Estevez et al., 2004; Petrović et al., 2004). Para além dos efeitos benéficos supracitados, as diferenças no perfil de ácidos gordos podem ser usadas como marcadores bioquímicos para a caracterização de cada espécie.

O teor de minerais também é importante, uma vez que estes participam em diversos processos metabólicos, como cofatores enzimáticos diretamente envolvidos nos processos da digestão, absorção e fornecimento de energia (Cruz et al., 2013; Gonçalves et al., 2010). Nas bolotas estão descritos o F, Cu, Zn, Mn, Ca, Mg, P e K (Rakić et al., 2006). Tal como acontece com as macromoléculas, o clima e a composição do solo (incluindo a flora microbiana) podem interferir no teor de minerais, provocando mudanças consideráveis nos atributos sensoriais e nutricionais deste fruto (Cañelas et al., 2003).

Os teores de compostos químicos e minerais descritos na bolota têm um elevado potencial como nutracêuticos, de alto valor em suplementos alimentares, ou como alimentos funcionais. Este facto aumenta o interesse do desenvolvimento de novas alternativas para a comercialização e valorização deste fruto. Além disso, as bolotas

podem ser ingredientes para novas aplicações na dieta humana como um substituto do milho, grão-de-bico, nozes, amendoins e azeitonas (Bainbridge, 2001).

De acordo com o conceito de sustentabilidade, as bolotas e os seus subprodutos também podem vir a ser substitutos de vários produtos, geralmente mais caros e com um impacto negativo no ambiente, especialmente na forma de óleo e farinha. A farinha de bolota pode ser um interessante substituto da farinha de trigo na produção de pão, respondendo a objetivos de inovação e valorização de produtos nacionais. A parte comestível (miolo) e os seus resíduos (casca) também podem ser considerados como uma mais-valia para outros fins, incluindo formulações sem glúten, conforme referido anteriormente.

1.3.1 Óleo de bolota

Devido aos desenvolvimentos nas áreas agrícola e genética, têm sido propostas novas culturas selvagens para a obtenção de óleos comestíveis. As bolotas são frutos edíveis, muito apreciados em diversos países do Mediterrâneo, usadas em culinária, na área da cosmética e na medicina tradicional (Al-Rousan et al., 2013; Rosenberg, 2008; Bainbridge, 2001). Vários estudos relatam que o teor de óleo em algumas espécies não ultrapassa os 12% (Rababah et al., 2008; Ozcan, 2007). No entanto, num estudo realizado por Ofcarcik et al. (1971) foram encontrados teores mais elevados (30%).

Alguns autores descrevem o óleo de bolota com sabor, valor nutricional e perfil lipídico idênticos ao azeite (Al-Rousan et al., 2013; Ozcan, 2007; Bainbridge, 2001) assim como certas características como a cor, índice de refração, coeficiente de extinção UV, índice de saponificação e índice de iodo (Al-Rousan et al., 2013; Lopes e Bernardo-Gil, 2005). Para além do valor nutritivo, o óleo de bolota apresenta boa estabilidade oxidativa (Al-Rousan et al., 2013). Charef et al. (2008) referiram que o perfil de ácidos gordos das espécies *Q. suber* e *Q. ilex* assemelhavam-se ao do óleo de lentisco (*Pistacia lentiscus*) e a outros óleos edíveis, como girassol, amendoim, algodão, abacate e azeite.

1.3.2 Farinha de bolota

Diferentes partes das plantas, incluindo sementes, tubérculos e miolo de diversos frutos têm sido usados como matéria-prima para a produção de farinha, alternativa às já normalmente consumidas, ou como ingrediente para novos produtos alimentares. A utilização de farinhas, a partir de diferentes fontes de alimentos, depende das propriedades reológicas, físico-químicas e funcionais dessas mesmas matérias-primas.

De acordo com Kaur e Singh (2007), o termo “funcional” é qualquer propriedade de um ingrediente alimentar, excluindo o seu valor nutritivo, que apresenta um impacto positivo na sua utilização. A viscosidade, a emulsificação e a formação de espuma são algumas dessas propriedades. Além disso, a funcionalidade das farinhas está associada a certos compostos químicos intrinsecamente relacionados com o material genético (espécie), condições de pós-colheita e condições edafo-climáticas (Correia e Beirão-da-Costa, 2011). Muitas matrizes vegetais ricas em amido têm despertado maior interesse nos últimos tempos devido à sua biodegradabilidade e ao seu baixo custo. O amido é o principal componente das bolotas, totalizando mais de 50% do seu miolo (Rababah et al., 2008). O elevado teor em fibras também já foi descrito em vários estudos, considerando que a farinha de bolota é um produto com propriedades biológicas relevantes, muito superiores à farinha de trigo (Rashid et al., 2014; Jawarmeh et al., 2013; Rakić et al., 2006).

Outra característica da farinha de bolota, e já referida anteriormente, é a ausência de glúten, fator relevante para a produção de produtos para celíacos, os quais requerem matérias-primas pré-selecionadas livres de proteínas (Korus et al., 2015). A aplicação do milho, arroz, sorgo e quinoa já foi descrita em produtos alimentares específicos (Pongjaruvat et al., 2014; Matos e Rosell, 2013; Torbica et al., 2010).

O amido é, sem dúvida, o componente mais importante da farinha de bolota. No entanto, a sua aplicação não é restrita à indústria alimentar. Segundo alguns autores, a utilização do amido pode ser importante para o fabrico de papel e de plástico, e na indústria têxtil, farmacêutica e cosmética (Matos e Rosell, 2015; O’Shea et al., 2014; Morais et al., 2013; Rodrigues e Emeje, 2012).

O desenvolvimento de novos produtos à base de farinha de bolota permite considerá-los alimentos funcionais, uma vez que este produto é uma boa fonte de compostos biologicamente ativos com propriedades comprovadas cientificamente (Rakić et al., 2006; Ozcan e Baycu, 2005).

Embora se saiba que a farinha de bolota apresenta propriedades funcionais, sensoriais e uma aceitação considerável, a informação disponível em relação à sua composição nutricional e química está longe de ser exaustiva. São necessários mais estudos para o seu conhecimento completo e para encontrar novas potencialidades deste fruto (Correia e Beirão-da-Costa, 2011).

1.4 Toxicidade

A maioria dos frutos das espécies *Quercus* é comestível. Poucos estudos reportam toxicidade nas bolotas. No entanto, foram descritos efeitos tóxicos em algumas espécies animais, galinhas, coelhos, cavalos e cabras (Martinson et al., 2007). A toxicidade das bolotas é, habitualmente, atribuída ao elevado teor de taninos, principalmente os condensados. Estes, por hidrólise, originam taninos elágicos e ácido gálico. Os taninos são compostos naturais que se complexam com as proteínas formando agregados em solução. A interação destes compostos com as proteínas salivares está na origem da sensação de adstringência de alguns frutos, especialmente os pouco maduros.

Relativamente à toxicidade das bolotas, Spier et al. (1987) observaram sintomas de gastroenterite em bovinos após a ingestão de diferentes partes das árvores do género *Quercus*, incluindo folhas, ramos e frutos. Também Plumlee et al. (1998) e mais recentemente Pérez et al. (2011) consideraram que os taninos hidrolisáveis são os responsáveis pelos efeitos clínicos supracitados. No entanto, os suínos parecem desenvolver proteção contra a toxicidade descrita, o que não acontece nas outras espécies de animais (Spier et al., 1987).

É importante lembrar que o mecanismo de toxicidade descrito nas bolotas não está totalmente esclarecido, mas muitos estudos sugerem que os taninos e os compostos resultantes da sua hidrólise podem causar efeitos adversos, devido às ligações químicas formadas com as proteínas (Smith et al., 2014). Apesar da toxicidade descrita, ainda não foi realizado nenhum estudo em seres humanos.

1.5 Compostos fitoquímicos

O conceito de biodiversidade alimentar é definido como a diversidade de plantas, animais, frutos selvagens e outros organismos utilizados na alimentação, que abrange os recursos genéticos dentro de espécies e entre espécies, proporcionados pelos ecossistemas (FAO, 2010). Devido ao elevado número de árvores do género *Quercus*, as bolotas diferem na sua composição química entre espécies, embora todas elas apresentem, na sua composição, compostos bioativos com propriedades importantes para a promoção da saúde humana (Silva et al., 2008; Rakić et al., 2006).

O binómio dieta-saúde representa um novo paradigma no estudo dos alimentos. Neste contexto, surge a ideia de que a alimentação adequada vai além do simplesmente

fornecimento de energia e nutrientes essenciais. Ela enfatiza também a importância dos fitoquímicos, associados a efeitos fisiológicos benéficos, que podem prevenir ou retardar doenças crónicas, tais como cardiovasculares (Pastor-Villaescusa et al., 2015; Rangel-Huerta et al., 2015), cancro (Papandreou et al., 2015; Liu, 2004; Kris-Etherton et al., 2002), processos inflamatórios (Senthilkumar e Kim, 2013; Gani et al., 2012), hipertensão (Eagappan e Sasikumar, 2014; Huang et al., 2013) e diabetes (Oh e Jun, 2014; Pinent et al., 2008), entre outras.

Os alimentos de origem vegetal constituem uma das principais fontes de compostos biologicamente ativos e de ácidos gordos polinsaturados. Entre estes, os frutos secos ou frutos de casca rija têm sido alvo de inúmeros estudos com o intuito de caracterizar exaustivamente os compostos fitoquímicos presentes.

De entre os compostos fenólicos, os ácidos fenólicos mais descritos na bolota são o ácido gálgico, derivados do ácido gálgico e o ácido elágico. Os flavonoides e os taninos são, também, identificados nas diferentes espécies de bolotas (Tejelerina et al., 2011; Rakić et al., 2006; Andrenšek et al., 2004; Cantos et al., 2003; Ferreira-Dias et al., 2003).

Também na medicina tradicional tem sido relatado o uso do miolo da bolota como adstringente, antidiarreico e antídoto para serpentes, e ainda usado no tratamento de aterosclerose, cancro, diabetes e Alzheimer, devido ao seu elevado teor de compostos fenólicos, taninos, ácido α -linoleico e ácidos gordos polinsaturados *n*-3 (Rakić et al., 2007).

Embora a maioria das espécies sejam comestíveis, algumas contêm elevados teores de taninos, responsáveis pelo amargor e adstringência dos frutos. A síntese destes compostos é um mecanismo de defesa da planta contra os predadores. No entanto, estes compostos podem proporcionar benefícios para a saúde humana, sendo reconhecidos alguns efeitos biológicos, tais como anticarcinogénicos e antimutagénicos (Chung et al., 1998). Também são atribuídos aspetos negativos aos taninos. São considerados antinutrientes, interferindo na absorção dos nutrientes (Chung et al., 1998).

A cozedura é um dos procedimentos usados para diminuir a concentração de taninos, promovendo a sua hidrólise e, conseqüentemente, eliminando as suas propriedades adstringentes. De acordo com vários autores, os procedimentos de cocção alteram as propriedades sensoriais e nutricionais das bolotas, melhorando as suas propriedades organoléticas, a biodisponibilidade de nutrientes e o tempo de conservação (Cruz et al., 2013; de Vasconcelos et al., 2010). Também podem ser assadas, depois de

descascadas (Deforce et al., 2009). Rakić et al. (2006) estudaram a influência do tratamento térmico nas características físicas e nutricionais da bolota, em relação ao teor de polifenóis totais, ácido gálgico, compostos azotados e macro e micro elementos. Concluíram que, na maioria das vezes, os constituintes químicos mantinham-se inalterados. Recentemente, Korus et al. (2015) referiram que os métodos de processamento térmico não afetam significativamente o sabor das bolotas.

1.6. Atividades biológicas

Durantes muitas décadas, os metabolitos secundários foram caracterizados apenas como produtos de excreção das plantas. No entanto, atualmente já é do conhecimento científico que muitos desses compostos para além de estarem diretamente envolvidos nos mecanismos de defesa e de proliferação das espécies vegetais, também apresentam atividades biológicas reconhecidas.

1.6.1. Atividade antioxidante

Existem vários estudos sobre a atividade antioxidante da bolota, associada a propriedades antimutagénica, anticarcinogénica e anti-envelhecimento (Silva et al., 2008; Rakić et al., 2006).

Alguns desses estudos foram realizados em diferentes extratos de bolotas e mostraram uma correlação positiva entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante (Tejerina et al., 2011; Rakić et al., 2007; Rakić et al., 2006; Cantos et al., 2003). Os compostos fenólicos são uma das cinco categorias de fitoquímicos encontrados em alimentos que podem ativar ou limitar a expressão de genes de vias que influenciam o risco de doença e produzem enzimas antioxidantes naturais (Yeh et al., 2009). Estes componentes são responsáveis pelas funções fisiológicas, biológicas e bioquímicas, principalmente devido à sua forte atividade antioxidante, mas também como estabilizadores das membranas celulares (Kodad et al., 2014; Żyżelewicz et al., 2014). Além disso, estes compostos são importantes na dieta humana para manter um nível adequado de antioxidantes e para equilibrar a produção e subsequente neutralização das espécies reativas de oxigénio (ERO), de azoto (ERA) e de enxofre (ERE) (Moo-Huchin et al., 2015). No entanto, está provado que o teor de compostos fenólicos do género *Quercus* depende da espécie, da fase de maturidade, da variação sazonal e da origem geográfica (Sánchez-Burgos et al., 2013; Andrenšek et al., 2004).

Popović et al. (2013) utilizaram a água como solvente extrator e analisaram a atividade antioxidante por dois métodos, FRAP e DPPH[•], das espécies, *Q. robur* e *Q. petraea*. Toori et al. (2013) avaliaram a atividade antioxidante das espécies *Q. ilex* e *Q. brantii*, em extratos obtidos com metanol, água e clorofórmio. Cantos et al. (2003) analisaram a atividade antioxidante da casca e do miolo das espécies *Q. ilex* e *Q. suber*, recorrendo a uma mistura metanol/água através dos ensaios de DPPH[•] e ABTS^{•+} (radical 2,2-azino-bis (3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato)). De facto, independentemente da natureza do solvente extrator e do método analítico utilizado, todos os estudos foram unânimes quanto ao potencial antioxidante deste fruto.

1.6.2 Atividade antimicrobiana

A investigação das atividades biológicas de extratos de plantas e produtos naturais revela o potencial das plantas como fonte de novos agentes de conservação. Os estudos sobre os extratos e compostos químicos de plantas têm aumentado nas últimas décadas, e têm sido aplicados na produção de medicamentos para humanos e animais. Não só os extratos, como também os óleos essenciais de diversas plantas, apresentam atividade biológica, o que justifica mais estudos sobre este assunto, nomeadamente na caracterização da atividade antimicrobiana. O Irão, a Índia e o Brasil são alguns dos países que usam plantas para aplicações antibacterianas. No Irão, produtos de *Quercus* têm sido utilizados como condimentos e agentes conservantes de alimentos, devido às suas propriedades antimicrobianas (Andrenšek et al., 2004).

O interesse nos alimentos prontos-a-comer aumentou nas últimas décadas. No entanto, este tipo de alimentos oferece condições ótimas de crescimento de bactérias produtoras de toxinas, caso do *Staphylococcus aureus*. Este é capaz de crescer e expressar virulência em diferentes alimentos, nomeadamente, produtos láteos, carnes e produtos cárneos, ovos e seus derivados, bolos e gelados (Bajalan et al., 2014; Balaban e Rasooly, 2000).

Uddin e Rauf (2012) estudaram a atividade antimicrobiana da espécie *Q. robur* em cinco bactérias diferentes (*S. aureus*, *S. epidermis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumonia*) mostrando que contém compostos biologicamente ativos com atividade antimicrobiana moderada. Andrenšek et al. (2004) também estudaram extratos hidroalcoólicos da mesma espécie e concluíram que as bolotas são uma matéria-prima promissora, com elevados teores de metabolitos secundários com atividade antimicrobiana considerável. Outros autores também descreveram atividade

antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas nas espécies *Q. resinosa* e *Q. persica* (Nourafcan et al., 2013; Sánchez-Burgos et al., 2013).

O uso indiscriminado de agentes antimicrobianos resultou no aparecimento de bactérias resistentes a drogas, fungos e vírus. Várias populações de países em desenvolvimento usam produtos naturais, provenientes de plantas, contra doenças infecciosas. Para responder ao aumento da resistência dos microrganismos patogénicos, os investigadores têm usado o conhecimento popular como fonte de desenvolvimento de novas drogas com alto potencial antimicrobiano. O uso de fitoquímicos como agentes antimicrobianos naturais, normalmente chamados “biocidas”, tem ganho popularidade. No entanto, convém não esquecer que as condições de extração destes compostos podem contribuir, em grande parte, para o aumento da atividade antimicrobiana (Berahou et al., 2007).

1.6.3 Outras atividades biológicas

Outras atividades biológicas foram descritas nas espécies *Quercus*, como atividade antiviral, atividade antitumoral, atividade coagulante e inibição da acetilcolinesterase.

Sabe-se que os produtos naturais com propriedades antiangiogénicas podem ser eficazes na prevenção de tumores malignos. Yarani et al. (2013) estudaram os efeitos da atividade citotóxica, antiproliferativa e antiangiogénica de *Q. infectoria*, usada no Irão, e provaram que o extrato hidroalcoólico da casca da bolota apresentou capacidade inibitória da angiogénese.

Frédérich et al. (2009) descreveram atividade anticancerígena contra três tipos de cancro (próstata, cólon e glioblastoma multiforme) nas folhas de *Q. robur*. Esta atividade é resultante do elevado teor em flavonoides e lectinas presentes nas mesmas.

Nos últimos anos a procura de coagulantes naturais tem vindo a aumentar. Sciban et al. (2009) investigaram a capacidade dos extratos de diferentes espécies de *Quercus* atuarem como coagulantes naturais, verificando que todos os extratos estudados possuíam capacidade de coagulação de 70%.

A ingestão de bolotas pode ajudar na prevenção de Alzheimer. A atividade da acetilcolinesterase (AChE) é considerada como um dos fatores etiológicos desta doença. Lee et al. (2005) num estudo realizado em ratos verificaram que a espécie *Q. acutissima* apresentou um efeito inibidor significativo sobre a atividade da AChE. Com base nestes

resultados, Han et al. (2012) realizaram um ensaio semelhante num humano saudável. Estes autores avaliaram o efeito inibidor da toma de 2 g de bolota, comparando com as habituais 16 g de galantamina (fármaco usado na doença de Alzheimer). Observaram que nas primeiras 24 horas após administração, a inibição da AChE provocada pela ingestão de bolotas era semelhante à provocada pelo fármaco.

Estes estudos reforçam a importância de pesquisas mais profundas, para o reaproveitamento das bolotas também na indústria farmacêutica, na prevenção de doenças degenerativas.

1.7. Objetivos

1.7.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como principal objetivo determinar a composição nutricional, química e a capacidade antioxidante de quatro espécies do género *Quercus*, colhidas a Norte de Portugal (Trás-os-Montes). Para a análise de cada espécie foram efetuadas três amostras distintas: bolota inteira, casca e miolo.

1.7.2 Objetivos específicos

- Estudo da variação morfométrica (comprimento, diâmetro e massa) das quatro espécies propostas no estudo (*Q. suber*, *Q. faginea*, *Q. nigra* e *Q. ilex*);
- Determinação da composição nutricional (humidade, cinzas, gordura, proteína e hidratos de carbono);
- Estudo do perfil lipídico (composição em ácidos gordos e vitamina E);
- Obtenção de extratos hidroalcoólicos, a partir de um processo de extração sólido/líquido.
- Determinação do teor de compostos fenólicos totais;
- Determinação do teor de clorofilas e carotenoides;
- Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos obtidos, recorrendo a dois ensaios diferentes e complementares (DPPH[•] e FRAP).

2. Material e Métodos

Todos os ensaios decorreram nos laboratórios do REQUIMTE/LAVQ (Laboratório Associado para a Química Verde) do Departamento de Ciências Químicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Este capítulo descreve as metodologias usadas na avaliação da composição nutricional, determinação de compostos bioativos e estudo da atividade antioxidante.

2.1 Reagentes e padrões

Todos os reagentes utilizados neste trabalho tinham grau analítico.

- Determinação do teor de proteína: pastilhas catalisadoras Kjeldahl ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{CuSO}_4$) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado 96% da Merck (Darmstadt, Alemanha); hidróxido de sódio (NaOH) da VWR International (Leuven, Bélgica); ácido bórico (H_3BO_3) da Panreac (Barcelona, Espanha).
- Determinação do teor de gordura total: sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) da Merck (Darmstadt, Alemanha); éter de petróleo da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA).
- Determinação do perfil em ácidos gordos: metanol da VWR International (Leuven, Bélgica); hidróxido de potássio (KOH) da Panreac (Barcelona, Espanha); n-hexano HPLC e sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) da Merck (Darmstadt, Alemanha); trifluoreto de boro (BF_3) da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA); mistura de padrões de ácidos gordos (FAME 37, Supelco, Bellefonte, PA, USA).
- Determinação do teor total de vitamina E e do perfil de tocoferóis e tocotrienóis: n-hexano HPLC da Merck (Darmstadt, Alemanha); 1,4-dioxano da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA); padrões de tocoferóis e tocotrienóis: α , β , γ , δ -tocoferol e α , β , γ , δ -tocotrienol da Calbiochem (La Jolla, CA, EUA); padrão interno de tocol: 2-metil-2-(4,8,12-trimetil tridecil)-cromano-6-ol da Matreya Inc (PA, EUA); etanol absoluto da Fisher Chemical (Loughborough, Inglaterra); hidroxitolueno butilado (BHT) da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha); sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) da Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Extração dos compostos bioativos: etanol absoluto da Fisher Chemical (Loughborough, Inglaterra).
- Determinação do teor total de compostos fenólicos: carbonato de sódio (Na_2CO_3) e ácido gálico da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA); reagente

de Folin-Ciocalteu da Merck (Darmstadt, Alemanha).

- Determinação do teor total de clorofilas e carotenoides: n-hexano e acetona adquiridos à Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Determinação da atividade antioxidante: 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH*), solução tripiridiltriazina (TPTZ), acetato de sódio, ácido acético glacial, cloreto férrico e sulfato ferroso da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA).

2.2 Recolha e tratamento das amostras

Em Portugal existem oito espécies diferentes de *Quercus* distribuídas por diferentes regiões: *Q. suber* (sobreiro); *Q. faginea* (carvalho português ou lusitano); *Q. nigra/pyrenaica* (carvalho negral); *Q. ilex/rotundifolia* (azinheira); *Q. robur* (carvalho-roble); *Q. canariensis* (carvalho de Monchique); *Q. coccifera* (carrasco); *Q. lusitanica* (carvalhiça).

Cada uma destas espécies difere entre si, no que respeita à copa, fruto, folha, flores, tronco e distribuição geográfica (Tree Names, 2015). Neste trabalho foram apenas selecionadas 4 espécies, as que predominam no norte de Portugal (Trás-os-Montes): *Q. suber*, *Q. faginea*, *Q. nigra* e *Q. ilex*.

As amostras para o trabalho que se apresenta foram colhidas em setembro de 2014. Formaram-se 3 grupos de amostras por espécie: fruto inteiro, miolo e casca, num total de doze amostras.

As diferentes amostras foram trituradas em moinho (Grindomix Retsch, Düsseldorf, Alemanha) até pó fino. De seguida, foram devidamente acondicionadas em frascos de amostragem e conservadas a -80 °C, para serem liofilizadas e posteriormente analisadas (Figura 3).



Figura 3 – Amostras trituradas e homogeneizadas para posterior análise.

2.3 Análise morfológica

Foram escolhidas aleatoriamente seis bolotas de cada espécie, procedendo-se à sua análise morfológica (massa, comprimento e diâmetro) (Figura 4).

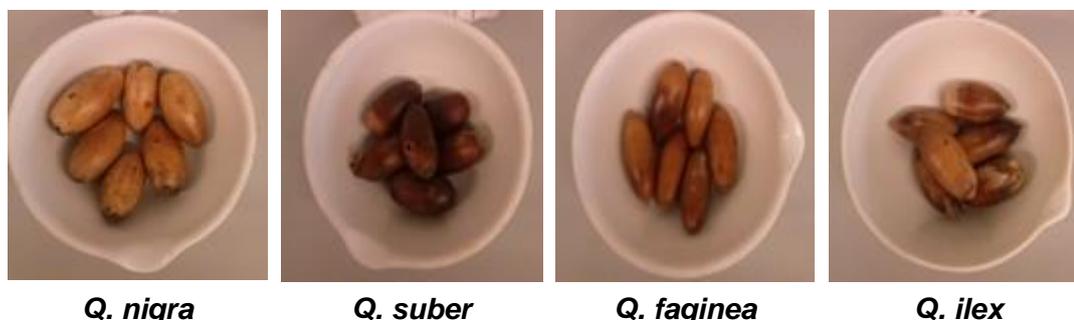


Figura 4 – Morfologia das amostras estudadas.

2.4 Análise centesimal

A análise centesimal teve por objetivo caracterizar o valor nutricional das amostras (fruto inteiro, miolo e casca), visando possíveis aplicações na indústria alimentar, farmacêutica ou cosmética, sem nunca esquecer o conceito de sustentabilidade.

2.4.1 Determinação do teor de humidade

O teor de humidade foi determinado com uma balança de determinação de humidade, equipada com uma lâmpada de infravermelhos (Scaltec® modelo SMO 01, Scaltec Instruments, Alemanha). Uma toma de 1-2 g, de acordo com o tipo de amostra, foi submetida a um processo de secagem a $100 \pm 2^\circ\text{C}$, até atingir uma massa constante. A análise foi realizada em triplicado para cada amostra e os resultados expressos em g/100 g de amostra fresca.

2.4.2 Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado por incineração direta de aproximadamente 1 g de amostra em mufla aquecida gradualmente até $500-550^\circ\text{C}$ (Thermolyne 48000, F48010-26, Electrothermal Engineering Ltd, Essex, Reino Unido) até obtenção de cinzas brancas, seguindo o método oficial da AOAC (Association of Analytical Communities) (AOAC 920.153, 2000). O teor de cinzas foi determinado pela diferença de massa antes e depois do processo de incineração. A análise foi realizada em triplicado e os resultados expressos em g/100 g de amostra em peso seco.

2.4.3 Determinação do teor de proteína

O teor proteico das amostras foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC 928.08, 2000), através da quantificação do azoto total presente nas amostras em estudo. Cerca de 0,5 g de amostra foram pesadas em papel isento de azoto e colocadas num tubo de Kjeldahl, juntamente com duas pastilhas catalisadoras (Kjeldahl tablets) e 20 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 96%). A digestão ácida foi efetuada no digestor automático K-438 (Büchi®, Büchi Labortechnik AG, Suíça) e os gases recolhidos no neutralizador de gases Scrubber B-414 (Büchi®, Büchi Labortechnik AG, Suíça). Desta forma, a matéria orgânica foi destruída por oxidação e o azoto orgânico originou sais de amónio.

Após a alcalinização do meio com 90 mL de hidróxido de sódio (NaOH, 32%), libertou-se amoníaco que, por destilação automática na unidade de destilação K-360 (Büchi®, Büchi Labortechnik AG, Suíça), foi recolhido em 60 mL de ácido bórico (H_3BO_4 %, pH 4,65), segundo o manual Büchi Labortechnik AG, 2007. Esta solução foi posteriormente titulada com H_2SO_4 (0,1 M) usando como indicador o vermelho de metilo. Na determinação do teor de proteína das amostras, os resultados da quantificação do azoto total foram multiplicados pelo fator de conversão 6,25 (FAO, 2012). As análises foram realizadas em triplicado e os resultados expressos em g/100 g de amostra em peso seco.

2.4.4 Determinação do teor de gordura total

O teor de gordura total foi determinado pelo método de Soxhlet (AOAC 991.36, 2000). Para tal, pesaram-se cerca de 5 g de amostra, à qual se adicionou uma quantidade suficiente de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para absorção da humidade e areia para evitar a colmatação à passagem do solvente. A mistura desumidificada foi transferida para cartuxos de celulose, seguidamente colocados em ampolas de extração dos dispositivos de Soxhlet. A extração foi efetuada a quente, com éter de petróleo, durante 8 horas, para balões de fundo redondo previamente tarados e identificados. Uma vez terminada a extração e recuperada a maior parte do solvente, procedeu-se à determinação da gordura extraída e evaporação do solvente remanescente, em estufa a 100 °C durante períodos de 30 minutos. De seguida, foram arrefecidos no exsiccador e pesados até obtenção de massa constante. As análises foram feitas em triplicado e os resultados apresentados em g/100 g de amostra em peso seco.

2.4.5 Determinação do teor de hidratos de carbono

O teor de hidratos de carbono foi obtido pelo método indireto, por diferença dos restantes parâmetros nutricionais das amostras, de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Hidratos de Carbono} = 100\% - (\% \text{ Proteínas} + \% \text{ Gordura} + \% \text{ Cinzas})$$

Os resultados foram apresentados em g/100 g de amostra em peso seco.

2.5 Determinação da composição em ácidos gordos

A determinação da composição em ácidos gordos foi efetuada na gordura extraída (ponto 2.4.4) e analisada por cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama (GC-FID).

A derivatização dos ácidos gordos em ésteres metílicos (FAME) foi efetuada de acordo com o método descrito por Shanta e Ackman (1990), com ligeiras modificações. O processo de transesterificação dos lípidos fez-se em meio alcalino e a metilação deu-se na presença de um catalisador, o trifluoreto de boro (BF_3 14% em metanol, solução comercial).

2.5.1 Derivatização

Num vial clear de 4 mL misturaram-se 40 μL de gordura e 3 mL de n-hexano. A essa mistura adicionaram-se 200 μL de solução metanólica de hidróxido de potássio 2 M e vortexou-se (VWR International) durante 1 minuto. De seguida, adicionaram-se cerca de 500 mg de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para retirar vestígios de água, voltou-se a vortexar e centrifugou-se (Heraeus Sepatech Labofuge Ae, Heraeus Instruments, Alemanha) a 3000 rpm durante 5 minutos para separação das fases aquosa e orgânica. Após repouso, o sobrenadante foi transferido para um vial clear de 4 mL com rolha de septo perfurável com mais um pouco de Na_2SO_4 , para retirar vestígios de água.

De seguida a fase orgânica foi transferida para um vial clear de 2 mL, para injetor automático, com rolhas perfuráveis, e conservado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até ao momento da análise cromatográfica (Fernandes et al., 2012).

2.5.2 Análise cromatográfica

Para a análise cromatográfica dos ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME) utilizou-se um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010 com um detetor de ionização de chama (Shimadzu, Columbia). O cromatógrafo estava equipado com uma coluna capilar

de sílica fundida CP-SIL 88 (Varian, Middelburg, The Netherlands; 50 mm x 0,25 mm diâmetro interno, 0,19 µm de espessura de filme). Usaram-se as seguintes condições analíticas: corrente gasosa de hélio, à pressão interna inicial de 120 kPa; temperatura da coluna 120 °C durante 5 minutos, programada para aumentar até 220 °C à velocidade de 3 °C/minuto, permanecendo a esta temperatura durante 10 minutos; temperatura do injektor e do detetor de 250 °C e 270° C, respetivamente; razão de split: 1:50; volume de injeção 1,0 µL. Cada injeção foi efetuada em duplicado. Os FAME foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com os da mistura de padrões de FAME. Para o tratamento dos dados recorreu-se ao software GS Solution (versão 2.30, Shimadzu GC Solution, Shimadzu, Columbia). Cada FAME foi expresso em % de peso dos FAME totais presentes no cromatograma (Fernandes et al., 2012; Casal e Oliveira, 2007).

2.6 Determinação do teor de vitamina E

A determinação do teor de vitamina E fez-se a partir da gordura extraída a frio, com n-hexano. Para a identificação dos compostos individuais prepararam-se soluções padrão em n-hexano (28; 21; 14; 7; 3; e 1,5 mg/ mL) contendo os seguintes vitâmeros: α, β, γ, δ-tocoferol e α, β, γ, δ-tocotrienol. Cada uma destas soluções continha 20 µL de padrão interno (PI, tocol) a uma concentração de 1 mg/ mL.

2.6.1 Preparação das amostras

A preparação das amostras para análise consistiu na pesagem de cerca de 1 g de cada amostra para tubos Supelco âmbar de 40 mL, aos quais se adicionaram 10 mL de n-hexano-BHT (0,01%), 20 µL de PI (padrão interno, tocol) e 5 mL de etanol absoluto. Agitou-se a mistura em vortex (VWR International) e centrifugou-se (Heraeus Sepatech Labofuge Ae, Heraeus Instruments, Alemanha) a 5000 rpm, durante 2 minutos. Seguidamente, transferiu-se a fase orgânica para tubos Supelco âmbar de 40 mL e voltou-se a extrair com 20 mL de n-hexano-BHT, vortexou-se e centrifugou-se nas condições acima referidas. Posteriormente juntaram-se as fases orgânicas e adicionou-se uma quantidade suficiente de sulfato de sódio anidro para absorção de toda a humidade, vortexou-se e procedeu-se a uma última centrifugação realizada nas mesmas condições de todas as anteriores.

De seguida, recolheu-se a camada de n-hexano para novos tubos Supelco âmbar de 40 mL, os quais foram colocados a evaporar sobre uma corrente de azoto (N₂) e retomou-se a amostra com 1 mL de n-hexano. Por fim, a gordura retomada em n-hexano foi transferida para tubos Supelco âmbar de 2 mL, para injetor automático, com rolhas perfuráveis, e conservados a -20 °C até posterior análise realizada por cromatografia líquida de alta performance com deteção por fluorescência (HPLC-FLD) (Alves et al., 2009).

2.6.2 Análise cromatográfica

A análise cromatográfica foi realizada num sistema HPLC da Jasco (Japão) equipado com um injetor automático (AS-2057), uma bomba (PU-2089) e um detetor de díodos (MD-2018) acoplado a um detetor de fluorescência FLD (FP-2020). A separação cromatográfica foi efetuada numa coluna de fase normal Supelcosil LC-SI (3 µm; 75 mm x 3,0 mm; Supelco, Bellefonte, EUA), à temperatura ambiente (21 °C). Utilizou-se como eluente uma mistura de n-hexano e 1,4-dioxano (98:2), a um fluxo de 0,7 mL/ minuto (Araújo et al., 2015).

Os compostos foram identificados com base nos seus espectros e tempos de retenção, comparativamente aos dos padrões. A sua quantificação foi efetuada pelo método do padrão interno, usando os cromatogramas obtidos com o detetor de fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}} = 290 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emissão}} = 330 \text{ nm}$). Os dados foram analisados no Software Borwin-PDA (JMBS, França). Todas as análises foram efetuadas em duplicado e os resultados expressos em mg/100 g de gordura.

2.7 Determinação do teor de clorofilas e carotenoides

Os pigmentos foram quantificados por espectrofotometria (Shimadzu-UV 1800 spectrophotometer, Japão). Aproximadamente 0,5 g de amostra foi submetida a um processo de extração com solvente constituído por 10 mL de mistura de acetona:hexano (4:6). A solução foi homogeneizada em vortex e centrifugada a 5000 rpm, durante 30 minutos. O sobrenadante foi recolhido e efetuaram-se leituras das absorvências a diferentes comprimentos de onda (663, 645, 505 e 453 nm) de forma a quantificar os teores de clorofilas e carotenoides, segundo o método descrito por Nagata e Yamashita (1992).

As leituras referentes a cada amostra e comprimento de onda foram feitas em triplicado e os resultados expressos em mg/g de amostra. Para o cálculos dos teores de clorofila a, clorofila b, β -caroteno e licopeno recorreu-se às seguintes fórmulas:

- Clorofila a (mg/ g) = $0,999A_{663} - 0,0989A_{645}$
- Clorofila b (mg/ g) = $- 0,328A_{663} + 1,77A_{645}$
- Licopeno (mg/ g) = $- 0,0458A_{663} + 0,204A_{645} + 0,372A_{505} - 0,0806A_{453}$
- β -caroteno (mg/ g) = $0,216A_{663} - 1,22A_{645} - 0,304A_{505} + 0,452A_{453}$

2.8 Compostos bioativos e atividade antioxidante

2.8.1 Preparação dos extratos

A avaliação dos compostos bioativos (fenólicos totais) e da atividade antioxidante foi determinada em extratos hidroalcoólicos. Para isso, as amostras (frutos inteiros, miolo e cascas) foram submetidas à extração com uma mistura etanol:água (50:50), por maceração (0,5 g/100 mL de solvente, durante 60 minutos a 40°C), seguindo-se as condições do método validado por Costa et al. (2014). A extração foi efetuada em placa de aquecimento com agitação constante de 600 rpm (Variomag, Telemodul 40 CT, Alemanha) e os extratos obtidos foram filtrados com papel de filtro Whatman No.1 e congelados a -25 °C, para posterior análise. Os extratos foram realizados em triplicado.

2.8.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais (CFT) dos extratos hidroalcoólicos foi determinado por espectrofotometria, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (RFC) (Moure et al., 2014). Os compostos fenólicos reagem com o RFC apenas em condições alcalinas (MacDonalds-Wicks et al., 2006). Seguindo a metodologia previamente descrita por Alves et al. (2009) foram colocados num tubo de ensaio 500 μ L de extrato (diluição 10x), branco ou padrão (solução de ácido gálico, 1000 ppm) aos quais se adicionaram 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (diluição 10x) e deixou-se reagir durante 5 min. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3 , 7,5%) e colocaram-se os extratos em banho a 45°C durante 15 minutos, seguido de 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, antes de ser determinada a absorvência a 765 nm, utilizando um Leitor de Microplacas Synergy HT (BioTek Instruments, Synergy HT GENS5, EUA). A correlação entre a absorvência da amostra e a concentração do padrão (ácido gálico) foi obtida através da reta de calibração (gama de linearidade: 0-150 mg/L, $R^2= 0,9973$) efetuada aquando das determinações (Figura 5).

O teor de fenólicos totais foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálgico (EAG) por g de amostra.

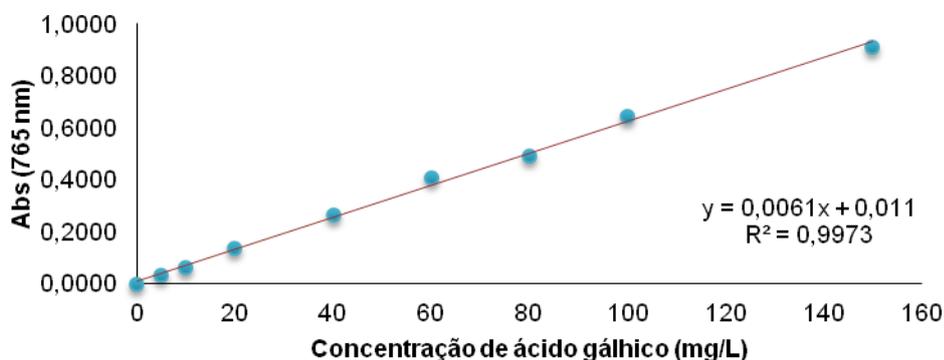


Figura 5 – Curva de calibração do ácido gálgico (mg/L).

2.8.3 Determinação da capacidade antioxidante

Os compostos prooxidantes estão implicados no desenvolvimento de doenças, entre elas, as doenças cardiovasculares, as inflamações crónicas e as doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson (Barroso et al., 2011; Stohs, 1995; Gutteridge, 1993).

Os compostos antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de retardar ou mesmo inibir substancialmente a oxidação do substrato (Niki, 2010), desempenhando um importante papel no controlo do processo oxidativo do organismo, por neutralização das espécies reativas.

Para a avaliação da atividade antioxidante foram realizados dois ensaios, segundo metodologias previamente descritas (Benzie e Strain, 1999; Brand-Williams et al., 1995): determinação da capacidade de neutralização do radical DPPH e avaliação do poder antioxidante por redução do ião férrico (método FRAP).

2.8.3.1 DPPH·

O DPPH é um radical estável utilizado para avaliar a capacidade redutora de radicais livres de compostos antioxidantes, através da redução da absorvência medida a 525 nm. Este ensaio decorreu de acordo com o método descrito por Brand-Williams et al. (1995) ao qual foram efetuadas ligeiras modificações.

A mistura da reação ocorreu numa placa de 96 poços, e consistiu, assim, em adicionar a 20 μL de extrato, 180 μL de solução etanólica de DPPH $^{\bullet}$ ($6,0 \times 10^{-5}$ mol/L) preparada na hora, e efetuar leituras a 525 nm em leitor de microplacas (BioTek Synergy HT, GENS5, EUA). O decréscimo de absorvência referente ao DPPH $^{\bullet}$ foi determinado de 2 em 2 minutos, até a reação estabilizar, o que demorou cerca de 40 minutos.

A atividade captadora de radicais (ACR) foi calculada como uma percentagem de descoloração, passando de violeta a amarelo. Os resultados foram expressos em % de inibição.

2.8.3.2 FRAP

O método FRAP, baseia-se na redução do complexo Fe (III) /ferricianeto [$\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] a Fe (II), forma ferrosa, pelo composto antioxidante na solução. Assim, determinou-se o poder antioxidante por redução do ião férrico, segundo metodologia previamente descrita por Guimarães et al. (2010).

Em tubo de ensaio, colocaram-se 90 μL de extrato, 270 μL de água destilada e 2,7 mL de reagente FRAP (75 mL de tampão acetato 0,3 M, 7,5 mL solução TPTZ 10 mM e 7,5mL FeCl_3 20 mM). Homogeneizou-se a solução e colocou-se em banho-maria a 37°C. Após 30 minutos, efetuaram-se as leituras das absorvências a 595 nm num leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT GENS5, EUA). O padrão sulfato ferroso 2 mM foi usado para obter a curva de calibração (gama de linearidade: 0-840 mg/ L, $R^2=0,9953$) efetuada aquando das determinações (Figura 6). Os resultados foram expressos em μmol sulfato ferroso/g de extrato seco.

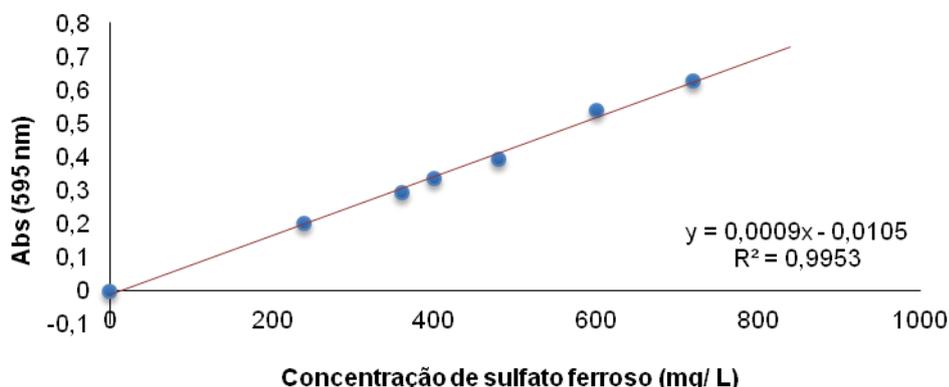


Figura 6 – Curva de calibração do sulfato ferroso (mg/L).

3. Resultados e Discussão

3.1 Análise morfológica

Vários estudos referem que as variações do tamanho das sementes são consequência da resposta adaptativa à variabilidade ambiental, como a latitude, a altitude, a temperatura e a disponibilidade de água (Ramirez-Valiente et al., 2009). O tamanho da semente é uma das características morfológicas com grande importância nos primeiros estágios do ciclo de vida de uma planta, pois controla a aptidão para a descendência.

Pouco se sabe sobre os motivos que provocam alterações nos parâmetros morfológicos destes frutos, uma vez que a maioria dos estudos publicados baseia-se em estimativas da produção de bolota, sem caracterizar concretamente a morfologia das diferentes espécies (Gea-Izquierdo et al., 2006). Encaixando-se nessa lacuna, este tópico visou analisar a variabilidade dos parâmetros morfológicos das bolotas de *Q. suber*, *Q. faginea*, *Q. nigra* e *Q. ilex* (Figura 7).

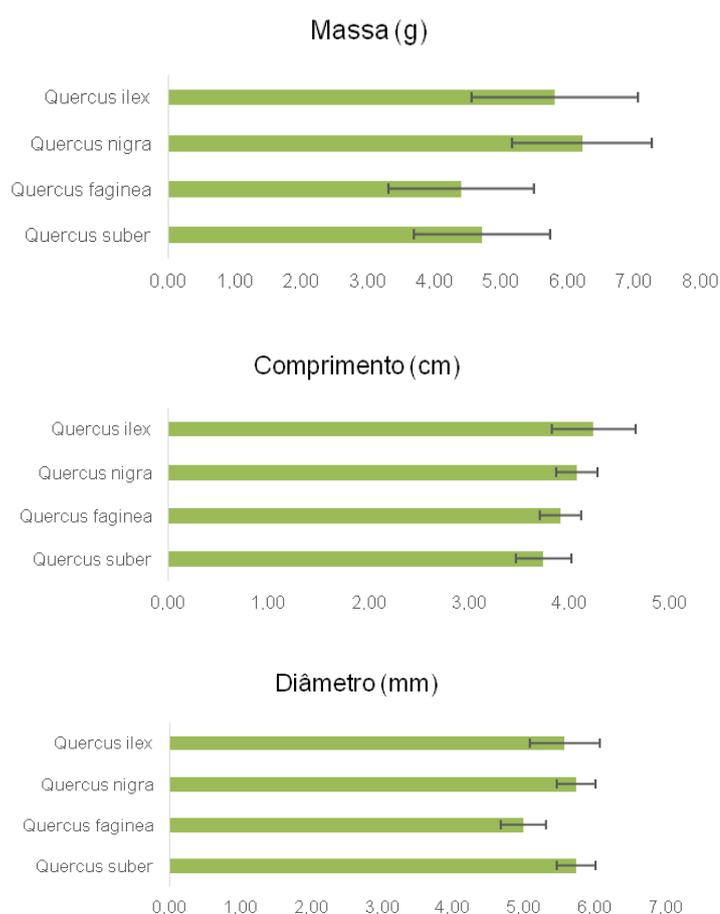


Figura 7 – Características morfológicas das espécies de *Quercus* estudadas.

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que as espécies *Q. nigra* e *Q. ilex* foram as que apresentaram maior massa e comprimento. No entanto, as espécies *Q. suber* e *Q. nigra* apresentaram maior diâmetro, evidenciando-se assim as diferenças morfológicas entre as espécies.

As massas das espécies estudadas estão de acordo com alguns estudos realizados por outros autores (Porras, 1998; Afzal-Raffi et al., 1992). No entanto, os valores reportados na literatura em relação ao diâmetro (0,69 – 2,07 cm), e ao comprimento (2,07 – 3,4 cm), não são tão idênticos aos obtidos (Carbonero et al., 2003; Porras, 1998). As espécies portuguesas apresentam diâmetros médios inferiores e comprimentos superiores aos descritos por Carbonero et al. (2003) na espécie *Q. ilex* de origem espanhola.

As diferenças existentes na morfologia das espécies estudadas devem-se essencialmente, às variáveis genéticas, pois foram colhidas na mesma altura em regiões próximas (Gea-Izquierdo et al., 2006). Relativamente à variação de peso, Álvarez et al. (2002) sugeriram que o aumento da massa das bolotas durante a frutificação pode estar relacionado com as infestações provocadas pelos insetos.

3.2 Análise química

3.2.1 Caracterização do perfil nutricional

A caracterização nutricional da bolota e dos seus subprodutos é muito importante para o aumento do conhecimento sobre estas matérias-primas, de modo a avaliar a sua possível aplicação na indústria. Os valores nutricionais determinados para as amostras estão resumidos na Tabela 1 e 2.

Tabela 1 – Valores nutricionais do fruto inteiro das espécies de *Quercus* estudadas.

Amostra (Fruto inteiro)	Humidade	Cinzas	Proteína	Gordura	Hidratos de carbono
<i>Q. suber</i>	53,86 ± 0,05	2,78 ± 0,01	9,73 ± 0,33	3,28 ± 0,20	84,43 ± 0,29
<i>Q. faginea</i>	47,88 ± 0,09	2,14 ± 0,01	7,28 ± 0,32	2,52 ± 0,31	88,26 ± 0,34
<i>Q. nigra</i>	50,91 ± 0,15	1,29 ± 0,04	5,52 ± 0,33	2,03 ± 0,11	91,84 ± 0,18
<i>Q. ilex</i>	31,52 ± 0,13	1,54 ± 0,01	4,52 ± 0,34	10,23 ± 0,27	92,34 ± 0,37

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) em g/100g.

Embora este fruto não seja consumido inteiro, achou-se interessante fazer a sua análise total como controlo e para, posteriormente, se compararem os seus teores com a parte edível (miolo) e a casca.

De uma maneira geral, os teores de humidade de amostra fresca foram semelhantes entre as espécies, embora a *Q. ilex* apresentasse um teor de humidade inferior (31,5 g/100g). Foi realizado um processo de desidratação, por liofilização, de forma a garantir uma redução homogénea dos teores de humidade em todas as amostras estudadas. Todas as espécies ficaram com teores inferiores a 10 g/100g. Na restante análise nutricional os valores foram convertidos para peso seco de amostra, de modo a uniformizar todos os parâmetros calculados.

Sabe-se que quanto maior o teor em cinzas menor o teor de matéria orgânica. Relativamente ao teor de cinzas observaram-se valores entre 1,29 e 2,78 g/100g, para as espécies *Q. nigra* e *Q. suber*, respetivamente. Estes valores são bem mais elevados quando comparados com os descritos por Carvalho et al. (2011) num estudo realizado em arroz integral e soja. Pio et al. (2014) descreveram teores de cinzas bastante inferiores em 11 espécies de castanha. O teor de cinzas também permite dar uma estimativa aproximada do teor mineral total presente na matriz alimentar, sendo um parâmetro nutricional importante.

As proteínas são constituintes de elevada importância dos alimentos, pois desempenham um papel biológico de extrema importância, exercendo funções a nível estrutural, enzimático, energético, hormonal e de defesa. O teor de proteínas das amostras variou entre 4,52 e 9,73 g/100g, destacando-se a espécie *Q. suber* como a mais rica em proteínas. A espécie *Q. ilex* foi a que apresentou um teor proteico inferior. Os resultados obtidos são bastante superiores aos descritos em 3 variedades de castanha nacional (Longal, Martinha e Viana), com 3,45, 3,60 e 3,39 g/100g, respetivamente (Guiné et al., 2004). No entanto, a qualidade proteica de uma matriz alimentar refere-se também à sua composição em aminoácidos, proporção e biodisponibilidade destes. Sugere-se assim, que num futuro trabalho seja realizado o perfil de aminoácidos nas diferentes espécies de bolotas.

O consumo excessivo de gordura poderá estar na origem de diversas doenças crónicas, sendo por este motivo fundamental uma escolha acertada do tipo e quantidade de gordura consumida. Desde os tempos mais remotos que os frutos secos e as sementes oleaginosas são considerados alimentos saudáveis, com elevado valor energético e ricos em ácidos gordos (AG) insaturados. Pela análise do teor de gordura

total obtido nas amostras estudadas (Tabela 1) a espécie *Q. ilex* apresenta valores significativamente mais elevados, 5 vezes mais do que a espécie *Q. nigra*. Relativamente ao teor de lípidos, e de acordo com os trabalhos publicados, a quantidade de lípidos totais presente nas bolotas é geralmente reduzida (Al-Rousan et al., 2013; Rodríguez-Estévez et al., 2008).

Os hidratos de carbono são as biomoléculas mais abundantes de qualquer organismo vivo. Apresentam numerosas aplicações comerciais como espessantes, emulsionantes e estabilizadores, devido à presença de amido. A concentração total de polissacarídeos, ou seja, o total de hidratos de carbono varia entre as diferentes espécies de bolotas, variando entre 84,43 e 92,34 g/100g.

Comparando os resultados obtidos com os já estudados por outros autores, verificou-se uma concordância de resultados. López-Carrasco et al. (2004), Aguilera et al. (2002) e Afzal-Rafii et al. (1992) obtiveram teores de cinzas de entre os 1,6 e 2,2 g/100g, de proteínas entre 4,8 e 5,6 g/100g, de gordura entre 6,3 e 12,1 g/100g, respetivamente. Relativamente aos teores de humidade e hidratos de carbono, Bainbridge et al. (2001) referiram valores de 8,7 a 44,6 g/100g e teores entre 32,7 e 89,7 g/100g, respetivamente.

Admitindo que a bolota é um fruto seco, cuja casca não é utilizada para a alimentação, foram efetuados os mesmos ensaios no miolo e na casca das quatro espécies (Tabela 2). O objetivo deste desdobramento de amostras visou potenciar o miolo como matéria-prima edível e promover possíveis aplicações da casca, atendendo ao conceito de sustentabilidade.

Tabela 2 – Valores nutricionais do miolo e casca das espécies de *Quercus* estudadas.

Amostra		Humidade	Cinzas	Proteína	Gordura	Hidratos de carbono
<i>Q. suber</i>	Miolo	47,92 ± 0,05	2,70 ± 0,11	9,01 ± 0,42	3,86 ± 0,03	85,32 ± 0,03
	Casca	34,75 ± 0,11	2,09 ± 0,03	8,00 ± 0,36	0,97 ± 0,16	87,63 ± 0,46
<i>Q. faginea</i>	Miolo	35,10 ± 0,13	1,93 ± 0,03	5,19 ± 0,33	3,82 ± 0,11	90,86 ± 0,25
	Casca	22,58 ± 0,05	1,97 ± 0,04	6,70 ± 0,85	0,50 ± 0,03	89,23 ± 0,97
<i>Q. nigra</i>	Miolo	43,00 ± 0,05	1,39 ± 0,01	5,19 ± 0,34	2,54 ± 0,09	91,97 ± 0,32
	Casca	23,22 ± 0,04	0,82 ± 0,02	3,82 ± 0,35	0,83 ± 0,04	94,52 ± 0,31
<i>Q. ilex</i>	Miolo	33,98 ± 0,10	1,27 ± 0,01	4,49 ± 0,00	12,01 ± 0,19	92,91 ± 0,04
	Casca	25,93 ± 0,09	1,10 ± 0,01	2,24 ± 0,15	1,07 ± 0,03	95,53 ± 0,17

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) em g/100g.

A análise nutricional do miolo e casca da bolota fresca, revelou uma elevada quantidade de água, uma vez que o teor de humidade está compreendido entre 22,6 g/100g (*Q. faginea*) e 47,9 g/100g (*Q. suber*). A liofilização, tal como na análise do fruto inteiro, mostrou-se eficaz, com uma redução abrupta dos teores deste parâmetro para valores inferiores a 10 g/100g. Observou-se que em todas as espécies os teores diferiram nos dois produtos (miolo e casca) sendo que a casca contém valores inferiores de humidade nas quatro espécies. Bainbridge (2001) afirmou que os teores de humidade nas espécies de *Quercus* se encontram entre 8,7 e 44,6 g/100g indo ao encontro dos valores obtidos.

O teor de cinzas não foi muito diferente entre o miolo e a casca de cada espécie. No entanto, a espécie *Q. suber* mostrou superioridade em ambas as frações (miolo e casca). Os resultados obtidos foram concordantes com os descritos por Cañelas et al. (2003). Segundo estes autores, num estudo realizado nas mesmas espécies, o teor de cinzas variou entre 2,0-2,5 g/100g e entre 1,8-2,2 g/100g para o miolo e casca, respetivamente. Rodríguez-Estévez et al. (2008) descreveram teores de 1,9 g/100g no miolo da espécie *Q. ilex*, mostrando concordância com os resultados obtidos neste trabalho.

De uma maneira geral, o teor de cinzas obtido no miolo das bolotas assemelharam-se aos descritos noutros frutos secos, como amêndoa (3,0 g/100g), noz (1,98 g/100g), amendoim (2,60 g/100g), castanha (1,10 g/100g), e avelã (2,45 g/100g) (INSA, 2010).

O teor de proteína bruta variou entre as espécies e entre as diferentes frações de cada uma delas. A espécie *Q. suber* apresentou superioridade no teor proteico tanto no miolo como na casca. Em contrapartida a espécie *Q. ilex* foi a que teve menor teor de proteína bruta. Correia et al. (2009) e Rodríguez-Estévez et al. (2008) também estudaram o miolo da espécie *Q. ilex* descrevendo um teor de 4,8 g/100g, bastante semelhante ao obtido neste estudo (4,5 g/100g). Num contexto geral, observou-se um comportamento idêntico em todas as espécies, sendo os teores de proteína superiores no miolo, com exceção da espécie *Q. faginea*. Neste caso em concreto, e devido à ausência de dados científicos que comprovem a diferença encontrada nesta espécie, apenas se sugere que sejam realizados novos ensaios que fundamentem a veracidade dos valores encontrados. No entanto, estes resultados experimentais foram concordantes com os obtidos por Cañelas et al. (2003). As diferenças encontradas entre espécies, mais uma vez, podem ser justificadas por fatores ambientais e genéticos, os quais podem influenciar o valor nutricional da bolota.

Relativamente ao teor de gordura total, e de acordo com os trabalhos publicados até à data, a quantidade de gordura total é pequena (Rosenberg, 2008; Gea-Izquierdo et al., 2006). De facto, as amostras analisadas apresentaram teores de gordura reduzidos, em alguns casos abaixo de 1 g/100g e nunca excedendo os 4 g/100g. A espécie *Q. ilex* foi uma exceção, evidenciando um teor de gordura de 12,0 g/100g no miolo. É de referir que neste parâmetro é esta a espécie que contém os teores mais elevados de gordura total, quando comparada com as restantes três espécies, embora o teor de gordura no miolo tenha sido sempre substancialmente superior ao encontrado nas cascas. Mesmo assim, esta espécie (*Q. ilex*) mostrou sempre teores de gordura total superiores em ambos os produtos (miolo e casca). O teor de gordura total do miolo desta espécie parece exageradamente alto, porém quando comparado com outros estudos, tais como o de Correia et al. (2009), Rodríguez-Estévez et al. (2008), e Afzal-Raffi et al. (1992) os resultados são concordantes com os descritos pelos autores, cujos valores foram 11,1 g/100g, 10,8 g/100g, e 11,3 g/100g, respetivamente.

Da fração lipídica foram estudados, nas quatro espécies de bolota, os ácidos gordos e a vitamina E, pelo que será efetuada uma discussão dos resultados obtidos posteriormente.

O teor de hidratos de carbono variou pouco entre a casca e o miolo de cada espécie. A espécie *Q. suber* foi a que teve menores teores e a *Q. ilex* a que apresentou teores mais elevados. A variação dos teores de hidratos de carbono encontrada nas cascas e no miolo foi de 87-95 g/100g e de 85-92 g/100g, respetivamente. Estes resultados são concordantes com os descritos na literatura (Bainbridge, 2001). A maior parte destes hidratos de carbono são polissacarídeos, e correspondem a fibra dietética (Sánchez-Machado et al., 2004), razão que fundamenta o incremento do consumo de bolota e o aproveitamento da casca para outras áreas industriais.

3.2.2 Ácidos gordos

Os lípidos são a principal forma de armazenamento de energia, fornecendo 9 kcal/g. Asseguram, por exemplo, a formação da bicamada lipídica das membranas celulares, desempenhando também um papel no funcionamento de enzimas, hormonas e sinalizadores intracelulares, entre outras funções reconhecidas (Nelson e Cox, 2005).

A composição total em FAME está descrita na Tabela 3 e 4, bem como o somatório das diferentes classes de ácidos gordos (SFA, MUFA, PUFA) e a relação ómega 3/ómega 6 (n-3/n-6) e ómega 6/ómega 3 (n-6/n-3). As Figuras 8 e 9 ilustram a

composição dos FAME presentes nas diferentes espécies de *Quercus* estudadas (fruto inteiro, miolo e casca).

Tabela 3 – Composição em ácidos gordos do fruto inteiro das espécies de *Quercus* estudadas.

Ácidos gordos	<i>Q. suber</i>	<i>Q. faginea</i>	<i>Q. nigra</i>	<i>Q. ilex</i>
	Fruto inteiro	Fruto inteiro	Fruto inteiro	Fruto inteiro
4:0	ND	ND	0,15±0,02	0,04±0,00
8:0	ND	ND	ND	0,01±0,00
10:0	ND	ND	0,01±0,00	ND
12:0	0,04±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00
14:0	0,22±0,00	0,13±0,02	0,16±0,00	0,07±0,00
15:0	0,10±0,00	0,08±0,00	0,10±0,01	0,02±0,00
16:0	13,49±0,00	15,96±0,64	15,93±0,35	12,83±0,01
17:0	0,15±0,00	0,09±0,00	0,10±0,01	0,08±0,00
18:0	1,29±0,02	1,74±0,07	1,91±0,20	ND
21:0	0,02±0,00	0,03±0,00	0,06±0,01	0,03±0,00
24:0	0,07±0,01	0,10±0,00	0,09±0,01	0,01±0,00
Σ SFA	15,38	18,15	18,53	13,10
16:1	2,23±0,00	0,32±0,03	0,59±0,03	0,18±0,00
18:1n9c	53,85±0,05	58,19±1,61	48,30±3,36	68,73±0,03
18:1n9t	ND	ND	ND	2,92±0,01
20:1	5,96±0,03	1,46±0,05	2,71±0,37	0,63±0,00
22:1n9	0,19±0,02	0,21±0,02	0,29±0,02	0,13±0,00
Σ MUFA	62,23	60,18	51,89	72,59
18:2n6c	21,67±0,17	20,50±0,69	28,16±3,25	13,35±0,04
18:3n3	0,24±0,04	0,48±0,02	0,55±0,03	0,52±0,00
18:3n6	0,16±0,01	0,49±0,02	0,52±0,04	0,35±0,00
22:2	0,04±0,01	0,04±0,00	0,05±0,00	0,02±0,00
Σ PUFA	22,13	21,51	29,30	14,24
n-3	0,24	0,48	0,55	0,52
n-6	21,83	20,99	28,68	13,70
n-6/n-3	90,96	43,73	52,15	26,35
n-3/n-6	0,01	0,02	0,01	0,04

ND – não detetado

Os valores são expressos através da média ± desvio padrão da % total de FAME detetados (n=3).

Apesar das bolotas não constituírem uma fonte convencional de gordura, por apresentarem valores de gordura total reduzidos, a sua pequena fração lipídica pode representar uma mais-valia na sua aplicação na indústria alimentar. De acordo com a Tabela 3, na composição em ácidos gordos, predominam os ácidos mono e polinsaturados (MUFA e PUFA, respetivamente), maioritariamente os monoinsaturados.

Os ácidos gordos saturados (SFA), variam entre 13,10% e 18,53% do total de FAME nas amostras analisadas. Destaca-se o ácido palmítico (C16:0), com teores

compreendidos entre 12,83% e 15,96%, sendo a espécie *Q. faginea* a que apresenta maiores teores. Na espécie *Q. ilex* verificou-se a presença do ácido caprílico (C8:0), que embora encontrado em quantidades reduzidas, não foi detetado nas outras espécies. Uma das possíveis justificações para a sua deteção na espécie *Q. ilex* poderá dever-se à diferença entre a proporção miolo/casca e fruto inteiro.

Relativamente aos ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), destaca-se o ácido oleico (C18:1n9c). O teor deste ácido gordo é bastante similar nas diferente espécies salientando que a espécie *Q. ilex* contém maior teor, tal como aconteceu quando analisado os seus subprodutos, como se irá verificar posteriormente. Os teores de MUFA nas amostras dos frutos variam entre 51,89% e 72,59% dos FAME totais.

No que diz respeito ao teor de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) verificaram-se diferenças entre as espécies. Os valores variaram de 14,24% (*Q. ilex*) a 29,30% (*Q. nigra*). O ácido linoleico (C18:2n6c) foi o maioritário, com valores entre 13,35% (*Q. ilex*) e os 28,16% (*Q. nigra*).

As bolotas possuem maior teor de ómega 6 do que ómega 3 no fruto inteiro (Tabela 3), com variações de 13,70-28,68% e de 0,24-0,55%, respetivamente.

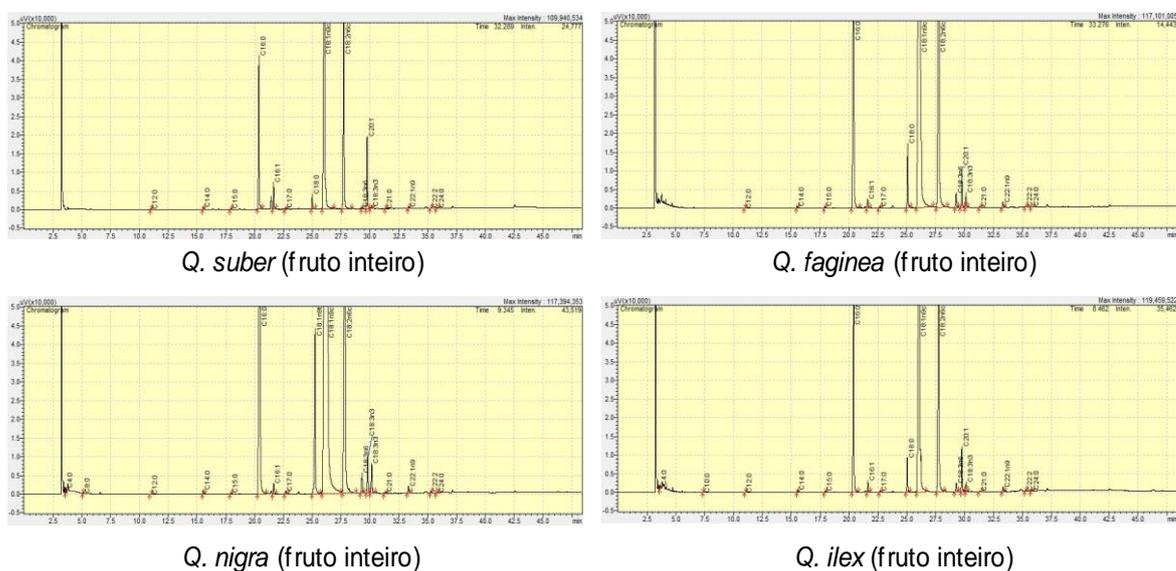


Figura 8 – Cromatogramas da análise de FAME do fruto inteiro das espécies de *Quercus* estudadas.

Tabela 4 – Composição em ácidos gordos do miolo e casca das espécies de *Quercus* estudadas.

Ácidos gordos	<i>Q. suber</i>		<i>Q. faginea</i>		<i>Q. nigra</i>		<i>Q. ilex</i>	
	Miolo	Casca	Miolo	Casca	Miolo	Casca	Miolo	Casca
4:0	ND	ND	ND	ND	0,25±0,01	0,71±0,12	0,03±0,00	1,08±0,05
8:0	0,01±0,00	ND	ND	ND	0,04±0,00	ND	ND	ND
10:0	0,02±0,00	ND	ND	ND	0,02±0,00	0,08±0,01	ND	ND
12:0	0,05±0,00	ND	0,01±0,00	0,44±0,03	0,03±0,00	0,31±0,00	0,01±0,00	0,10±0,00
14:0	0,27±0,02	1,56±0,10	0,07±0,00	1,76±0,02	0,17±0,00	0,93±0,04	0,06±0,00	0,56±0,13
15:0	0,07±0,00	0,79±0,06	0,06±0,00	0,50±0,04	0,09±0,00	0,39±0,00	0,02±0,00	0,30±0,06
16:0	14,71±0,39	12,76±0,20	14,62±0,30	22,54±0,34	15,24±0,03	18,53±0,16	12,60±0,11	15,53±0,15
17:0	0,11±0,00	ND	0,08±0,00	0,41±0,07	0,09±0,00	0,32±0,04	0,08±0,00	0,25±0,00
18:0	1,49±0,02	3,44±0,08	1,77±0,00	3,41±0,10	1,64±0,01	3,87±0,07	ND	3,44±0,08
21:0	0,03±0,01	ND	0,03±0,00	ND	0,04±0,00	ND	0,03±0,00	ND
24:0	0,11±0,01	4,44±0,11	0,02±0,00	5,44±0,11	0,04±0,01	ND	0,01±0,00	0,85±0,34
Σ SFA	16,88	22,99	16,66	34,50	17,65	25,14	12,84	22,11
16:1	0,69±0,02	ND	0,28±0,00	0,40±0,06	0,22±0,01	0,60±0,02	0,08±0,00	0,70±0,15
18:1n9c	54,59±0,24	53,36±0,81	59,01±0,01	24,81±0,06	47,12±0,12	45,58±0,70	69,05±0,14	53,79±1,29
18:1n9t	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,02±0,02	ND
20:1	3,69±0,02	2,46±0,21	1,12±0,02	13,69±0,24	2,43±0,01	7,22±0,09	0,59±0,00	3,66±0,05
22:1n9	0,15±0,00	ND	0,18±0,00	1,35±0,12	0,15±0,00	0,92±0,05	0,12±0,00	0,66±0,02
Σ MUFA	59,12	55,82	60,59	40,25	49,92	54,32	72,86	58,81
18:2n6c	23,19±0,06	17,82±0,05	21,56±0,04	19,25±4,16	31,21±0,12	17,96±0,00	13,34±0,00	16,77±0,84
18:3n3	0,43±0,01	ND	0,47±0,01	ND	0,55±0,01	0,26±0,01	0,52±0,00	0,37±0,03
18:3n6	0,19±0,00	ND	0,46±0,00	0,53±0,30	0,40±0,00	0,64±0,02	0,34±0,00	0,58±0,00
22:2	0,04±0,01	ND	0,03±0,00	ND	0,22±0,00	ND	0,02±0,00	ND
Σ PUFA	23,88	17,82	22,52	19,78	32,41	18,86	14,22	17,72
n-3	0,43	ND	0,47	ND	0,55	0,26	0,52	0,37
n-6	23,38	17,82	22,02	19,78	31,61	18,60	13,68	17,56
n-6/n-3	54,37	ND	46,85	ND	57,47	71,54	26,31	47,46
n-3/n-6	0,02	ND	0,02	ND	0,02	0,01	0,04	0,02

ND – não detetado

Os valores são expressos através da média ± desvio padrão da % total de FAME detetados (n=3).

De acordo com a Tabela 4, e tal como aconteceu na análise do fruto inteiro, predominam os ácidos gordos insaturados (MUFA e PUFA), destacando-se, mais uma vez, os monoinsaturados. Os ácidos gordos insaturados variam entre 14,22 e 72,86% do total de FAME, sendo similar o teor destes compostos nas diferentes espécies de *Quercus* estudadas.

A composição dos ácidos gordos saturados e insaturados é bastante similar à encontrada no fruto inteiro. O ácido palmítico (C16:0) é o SFA predominante. O seu teor foi bastante semelhante nas diferentes espécies, variando entre 12,60% (*Q. ilex*) e 15,24% (*Q. nigra*) no miolo e entre 12,76% e 22,54% nas cascas (*Q. suber* e *Q. faginea*, respetivamente). Todas as espécies analisadas contêm ainda percentagens mais baixas

de ácido láurico (C12:0), ácido mirístico (C14:0), ácido pentadecanóico (C15:0), ácido heptadecanóico (C17:0), ácido esteárico (C18:0). Também foram encontradas percentagens baixas de ácido butírico (C4:0), ácido caprílico (C8:0), ácido cáprico (C10:0), ácido heneicosanóico (C21:0) e ácido lignocérico (C24:0), porém estes não estão presentes em todas as espécies analisadas. Os SFA variam, assim, entre 12,84% e 34,50% dos FAME totais.

Relativamente aos MUFA, mais uma vez foram encontradas semelhanças nas quantidades presentes no miolo e na casca. O ácido oleico (C18:1n9c) foi predominante e similar em ambos os produtos analisados (miolo e casca) e é a espécie *Q. ilex* que contém teores mais elevados. Outros estudos revelaram percentagens semelhantes de ácido oleico nas espécies (Al-Rousan et al., 2013; Bernardo-Gil e Lopes, 2005; Ferreira-Dias et al., 2003). As amostras também apresentam teores reduzidos, de ácido palmitoleico (C16:1), cis-11-ácido eicosanóico (C20:1) e ácido erúico (C22:1n9). O miolo da espécie *Q. ilex* apresentou ainda teores de ácido eláidico (C18:1n9t). No âmbito geral, os teores de MUFA obtidos nas amostras estudadas variaram entre 40,25% a 72,86% dos FAME totais.

No que diz respeito ao teor de PUFA as diferenças observadas entre os frutos inteiros também foram encontradas no miolo e casca das 4 espécies. Observaram-se diferenças entre espécies, embora pouco significativas. Os valores rondaram os 17,82% e os 32,41%, com a exceção da espécie *Q. ilex* que apresentou teores inferiores, na ordem dos 14%. Neste caso concreto, o ácido linoleico foi predominante no miolo (C18:2n6c), tendo-se observado apenas valores superiores na casca da espécie *Q. ilex*. As amostras apresentam baixas quantidades de ácido α - e γ -linoleico (C18:3n3 e C18:3n6) e cis-13,16-ácido docosadienóico (C22:2), sendo que este último não foi detetado em nenhuma casca das espécies em estudo.

A bolota, independentemente das espécies, representa uma fonte importante de PUFA, nomeadamente ácidos gordos ómega 3 e ómega 6, fundamentais na formação de estruturas lipídicas e de elementos na membrana celular. Estas duas classes de PUFA têm funções diferentes e por isso a sua relação é importante para o normal crescimento e desenvolvimento. Estes ácidos gordos são benéficos na prevenção de doenças cardiovasculares e doenças crónicas, como a diabetes e a hipertensão (Calder e Grimble, 2002).

Por outro lado, os efeitos benéficos supracitados dependem da razão ómega 6/ómega3 (n-6/n-3) das amostras. A Sociedade Europeia de Nutrição, recomenda que

esta relação não ultrapasse os 5. No entanto, atualmente, o tipo de alimentação praticada nos países europeus apresenta relações muito superiores.

O perfil de ácidos gordos da maioria das espécies de bolota é caracterizado por um elevado teor em PUFA ómega 6 e baixo teor de ómega 3, consequentemente a razão n-6/n-3 é bastante elevada.

Embora não haja dados na literatura científica relativamente à espécie *Q. faginea* (talvez por ser uma espécie autóctone portuguesa), os resultados obtidos nas outras espécies vão ao encontro de outros estudos já publicados (Al-Rousan et al., 2013; Tejerina et al., 2011; Bernardo-Gil e Lopes, 2005; Cantos et al., 2003; Ferreira-Dias et al., 2003; Bainbridge, 2001; Ferrão e Ferrão, 1988).

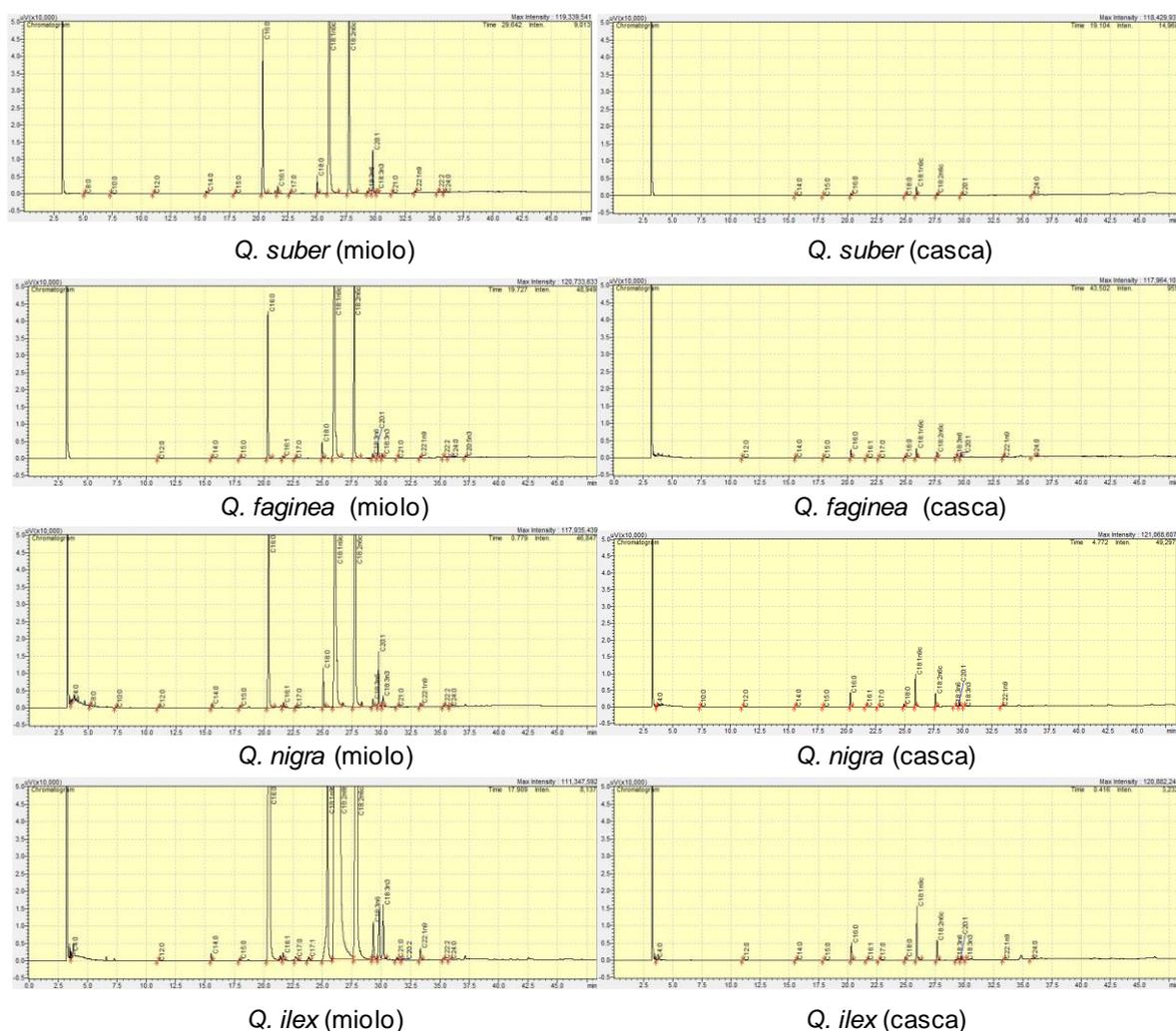


Figura 9 – Cromatogramas da análise de FAME do miolo e da casca das espécies de *Quercus* estudadas.

3.2.3 Vitamina E

A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel composta por um conjunto de oito vitâmeros divididos em quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis, e apenas as plantas são capazes de as sintetizar. A vitamina E desempenha um papel fundamental na proteção do organismo contra os efeitos prejudiciais das espécies reativas de oxigénio (ERO). Este componente tem interesse na saúde do consumidor e também na preservação dos produtos alimentares, como antioxidante natural (Yoshida et al. 2003). Nas Tabelas 5 e 6 apresentam-se os teores de vitâmeros da vitamina E para as amostras em estudo.

Tabela 5 – Valor total de vitamina E e dos diferentes vitâmeros do fruto inteiro das espécies de *Quercus* estudadas.

Vitâmeros	<i>Q. suber</i>	<i>Q. faginea</i>	<i>Q. nigra</i>	<i>Q. ilex</i>
	Fruto Inteiro	Fruto Inteiro	Fruto Inteiro	Fruto Inteiro
α -tocoferol	2,40 \pm 0,05	18,28 \pm 0,19	1,98 \pm 0,01	0,67 \pm 0,02
β -tocoferol	0,11 \pm 0,00	0,85 \pm 0,02	0,10 \pm 0,01	0,03 \pm 0,00
γ -tocoferol	1,00 \pm 0,01	5,27 \pm 0,06	4,41 \pm 0,06	5,84 \pm 0,21
δ -tocoferol	0,06 \pm 0,00	0,59 \pm 0,01	0,15 \pm 0,00	0,21 \pm 0,00
α -tocotrienol	0,04 \pm 0,00	0,13 \pm 0,02	ND	0,04 \pm 0,00
β -tocotrienol	ND	ND	ND	ND
γ -tocotrienol	ND	ND	ND	ND
δ -tocotrienol	ND	ND	ND	ND
Total	3,61	25,09	6,65	6,80

ND – não detetado.

Os valores são expressos através da média \pm desvio padrão em mg/100g de gordura (n=3).

Pela análise da Tabela 5, há semelhança nos teores de vitâmeros em todas as amostras estudadas. As quatro espécies contêm todos os tocoferóis e apenas uma forma de tocotrienol, o α -tocotrienol.

O vitâmero predominante no fruto inteiro nas espécies *Q. nigra* e *Q. ilex* foi o γ -tocoferol, com valores entre 4,4 e 5,8 mg/100g de gordura. Enquanto que nas espécies *Q. suber* e *Q. faginea* foi o vitâmero α -tocoferol com teores de 2,4 e 18,3 mg/100g de gordura, respetivamente. Com exceção destes dois vitâmeros todos os outros apresentaram valores inferiores a 1 mg/100g de gordura.

A espécie com maior quantidade de vitamina E foi a espécie *Q. faginea*, o que não está de acordo com os resultados obtidos no miolo e na casca, como se irá verificar. Esta variabilidade entre valores pode ser justificada, uma vez mais, pela proporção não equivalente entre miolo e casca.

Tejerina et al. (2011) obtiveram a mesma relação entre α e γ -tocoferol, ou seja, mais quantidade de γ -tocoferol do que α -tocoferol. No entanto, os valores descritos pelos autores foram bastante superiores aos obtidos neste estudo. Tal facto pode ser justificado não só pelas variações de origem e colheita das amostras, como também pela diferença do método de extração usado.

Tabela 6 – Valor total de vitamina E e dos diferentes vitâmeros do miolo e casca das espécies de *Quercus* estudadas.

Vitâmeros	<i>Q. suber</i>		<i>Q. faginea</i>		<i>Q. nigra</i>		<i>Q. ilex</i>	
	Miolo	Casca	Miolo	Casca	Miolo	Casca	Miolo	Casca
α -tocoferol	0,96 \pm 0,03	3,14 \pm 0,02	2,44 \pm 0,05	0,18 \pm 0,01	1,80 \pm 0,10	2,79 \pm 0,17	0,77 \pm 0,07	0,59 \pm 0,03
β -tocoferol	0,04 \pm 0,01	0,06 \pm 0,00	0,07 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,19 \pm 0,02	0,03 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00
γ -tocoferol	12,43 \pm 1,78	1,02 \pm 0,03	4,66 \pm 0,04	4,93 \pm 0,06	16,94 \pm 0,72	1,39 \pm 0,05	8,70 \pm 0,81	0,30 \pm 0,02
δ -tocoferol	0,34 \pm 0,03	0,08 \pm 0,00	0,14 \pm 0,00	0,09 \pm 0,00	0,27 \pm 0,00	0,17 \pm 0,00	0,26 \pm 0,02	0,05 \pm 0,00
α -tocotrienol	0,04 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	ND	0,02 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	ND	0,04 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00
β -tocotrienol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
γ -tocotrienol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
δ -tocotrienol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	13,80	4,32	7,30	5,24	19,10	4,54	9,80	0,98

ND – não detetado.

Os valores são expressos através da média \pm desvio padrão em mg/100g de gordura (n=3).

Pela análise da Tabela 6 verificou-se que as amostras são compostas, essencialmente por α -tocoferol e γ -tocoferol. O vitâmero mais abundante nas espécies analisadas é o γ -tocoferol, com valores entre 0,3 e 16,9 mg/100g de gordura.

Em termos globais foi o miolo que apresentou maior quantidade de vitamina E. Resumidamente, o miolo da espécie *Q. nigra* foi o que obteve teores superiores de vitamina E, enquanto o miolo da espécie *Q. faginea* apresentou teores inferiores. Relativamente à casca, a espécie *Q. faginea* apresentou valores superiores em vitamina E e a espécie *Q. ilex* o menor valor.

O vitâmero α -tocoferol também se destaca em relação aos restantes vitâmeros, sendo a espécie *Q. faginea* a mais rica. Salvo algumas exceções, os valores obtidos dos restantes vitâmeros foram inferiores a 1 mg/100g de gordura.

Além da sua utilização a nível alimentar, a vitamina E tem tido novas aplicações na indústria cosmética, sendo utilizada para a produção de nanoemulsões benéficas para a prevenção do envelhecimento da pele (Pereira, 2012). Assim, este estudo mostrou que a utilização das cascas de bolota poderá ser uma fonte rica em antioxidantes naturais. Os benefícios para a saúde atribuídos à utilização da vitamina E, faz com que a casca e o

miolo das diferentes espécies possam ser utilizadas em novas aplicações, nas áreas alimentar, farmacêutica e cosmética.

3.3 Compostos bioativos e atividade antioxidante

As propriedades antioxidantes consistem em retardar a oxidação de vários compostos "importantes para a vida", inibindo a iniciação ou a propagação de reações em cadeia (Amarowicz et al., 2004). Desde a prevenção de reações de oxidação em alimentos, medicamentos e cosméticos até ao papel das espécies reativas de oxigénio (ERO) em doenças como o cancro, doenças cardiovasculares, inflamatórias, neurodegenerativas e autoimunes, a atividade antioxidante é fundamental para retardar qualquer um dos processos referidos (Magalhães et al., 2008).

3.3.1 Determinação do teor de clorofilas e carotenoides

Segundo Popović et al. (2013) os carotenoides, juntamente com os compostos fenólicos, são responsáveis pelas cores brilhantes das plantas e também são poderosos antioxidantes. Os carotenoides podem proteger as membranas contra danos provocados por radicais livres e retardam os processos de envelhecimento (Bulda et al., 2008). A pigmentação castanha característica da bolota madura é devida às clorofilas a e c e aos carotenoides.

Nas Tabelas 7 e 8 estão apresentados os valores dos teores de clorofilas e carotenoides para as amostras em estudo.

Tabela 7 – Valores dos pigmentos presentes no fruto inteiro das espécies de *Quercus* estudadas.

Amostra		Clorofila a	Clorofila b	Licopeno	β-caroteno
<i>Q. suber</i>	Fruto Inteiro	2,78 ± 0,03	0,90 ± 0,05	0,28 ± 0,01	0,38 ± 0,04
<i>Q. faginea</i>	Fruto Inteiro	0,20 ± 0,02	0,27 ± 0,02	0,07 ± 0,00	0,29 ± 0,00
<i>Q. nigra</i>	Fruto Inteiro	4,47 ± 0,09	2,41 ± 0,02	0,21 ± 0,01	1,05 ± 0,04
<i>Q. ilex</i>	Fruto Inteiro	1,02 ± 0,05	1,03 ± 0,06	0,29 ± 0,01	0,14 ± 0,03

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) em mg/g.

Pela análise dos resultados da Tabela 7, foram encontrados teores de clorofilas muito diferentes entre as espécies. Os teores de clorofila a variaram entre 0,20 mg/g (*Q. faginea*) e 4,47 mg/g (*Q. nigra*), enquanto que os teores de clorofila b variaram entre 0,27 mg/g (*Q. faginea*) e 2,41 mg/g (*Q. nigra*). O teor médio de carotenoides foi

significativamente inferior ao teor de clorofilas, sendo que a espécie *Q. nigra* mostrou ser a que contém maiores teores de clorofilas e carotenoides.

Tabela 8 – Valores dos pigmentos presentes no miolo e casca das espécies de *Quercus* estudadas.

Amostra		Clorofila a	Clorofila b	Licopeno	β -caroteno
<i>Q. suber</i>	Miolo	0,04 \pm 0,00	0,07 \pm 0,01	0,02 \pm 0,00	0,20 \pm 0,00
	Casca	8,74 \pm 0,19	3,07 \pm 0,03	ND	3,72 \pm 0,06
<i>Q. faginea</i>	Miolo	3,56 \pm 0,00	1,83 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	1,41 \pm 0,00
	Casca	8,89 \pm 0,01	4,50 \pm 0,05	0,40 \pm 0,07	2,50 \pm 0,09
<i>Q. nigra</i>	Miolo	0,20 \pm 0,00	0,29 \pm 0,00	0,09 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01
	Casca	8,96 \pm 0,05	5,21 \pm 0,04	ND	2,87 \pm 0,08
<i>Q. ilex</i>	Miolo	0,59 \pm 0,01	0,97 \pm 0,00	0,31 \pm 0,03	0,07 \pm 0,00
	Casca	4,71 \pm 0,02	2,65 \pm 0,02	0,06 \pm 0,00	1,15 \pm 0,00

ND – não detetado.

Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3) em mg/g.

De forma a potenciar o consumo do miolo da bolota e possível reaproveitamento da casca, as determinações dos teores de clorofilas e carotenoides foram igualmente realizadas. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8, observou-se uma variação entre 0,02 (*Q. suber*) e 0,31 (*Q. nigra*) mg/g nos teores de licopeno e teores entre 0,06 (*Q. nigra*) e 1,41 (*Q. faginea*) mg/g em relação ao teor de β -caroteno, no miolo das diferentes espécies. A concentração de carotenoides foi manifestamente superior nas cascas, com valores compreendidos entre 0,06 mg/g (licopeno) e 3,72 mg/g (β -caroteno), correspondendo às espécies *Q. ilex* e *Q. suber*, respetivamente.

No que respeita ao teor de clorofilas, também as suas concentrações foram significativamente superiores na casca. A espécie com maior teor de clorofilas no seu miolo foi a espécie *Q. faginea* (3,56 mg/g de clorofila a e 1,83 mg/g de clorofila b), enquanto que a espécie *Q. suber* apresentou o menor valor (0,04 mg/g de clorofila a e 0,07 mg/g de clorofila b). No que diz respeito à casca, a espécie *Q. nigra* apresentou o maior teor de clorofilas (8,96 mg/g de clorofila a e 5,21 mg/g de clorofila b) e a espécie *Q. ilex* o menor (4,74 mg/g de clorofila a e 2,65 mg/g de clorofila b). De acordo com o nosso conhecimento, este estudo sobre o teor de clorofilas e carotenoides foi pioneiro, razão pela qual não existem dados publicados que possam fornecer um termo de comparação.

Este estudo mostrou ser importante, na medida em que a cor é um dos atributos mais importantes dos frutos, sendo um indicador de qualidade e do grau de maturação dos mesmos. Os pigmentos apresentam efeitos benéficos para a saúde, pelas suas propriedades antimutagénicas e antígenotóxicas (Lila, 2004; Ferruzzi et al., 2002) e são utilizados por apresentarem atividade pró-vitáminica A, resultando na promoção de funções biológicas benéficas, tais como o fortalecimento do sistema imunológico (Souza et al., 2012) e a diminuição do risco de doenças degenerativas, como cancro, doenças cardiovasculares, degeneração macular e cataratas (Silva et al., 2014; Rodrigues et al., 2013; Souza et al., 2012).

3.3.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos são considerados um dos grupos mais importantes para a atividade antioxidante. O consumo de alimentos ricos neste tipo de compostos contribui para a prevenção de doenças (Cartea et al., 2011). A realização do ensaio colorimétrico teve como objetivo a quantificação do teor de compostos fenólicos totais (CFT) presentes nas amostras. Estes componentes são oxidados formando complexos de cor azul, a qual absorve a 750nm. Os valores obtidos estão representados na Tabela 9. Tal como foi referido no capítulo 2 (materiais e métodos), para a realização da determinação do teor de fenólicos totais e da atividade antioxidante, foi necessário proceder-se a uma extração sólido-líquido, com uma mistura de solventes (etanol:água, 50:50).

Tabela 9 – Teor de fenólicos totais das espécies de *Quercus* estudadas.

Amostra		CFT
<i>Q. suber</i>	Fruto inteiro	27,74 ± 0,13
	Miolo	30,05 ± 0,08
	Casca	26,94 ± 0,20
<i>Q. faginea</i>	Fruto inteiro	35,03 ± 0,08
	Miolo	38,25 ± 0,54
	Casca	22,62 ± 0,13
<i>Q. nigra</i>	Fruto inteiro	28,58 ± 0,20
	Miolo	25,52 ± 0,08
	Casca	41,48 ± 0,27
<i>Q. ilex</i>	Fruto inteiro	17,81 ± 0,15
	Miolo	19,51 ± 0,00
	Casca	18,22 ± 0,07

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) em mg EAG/g extrato seco.

Numa primeira análise observam-se diferenças entre as 4 espécies estudadas. Os resultados obtidos dos extratos do fruto inteiro demonstraram que a espécie com teores mais elevados foi a espécie *Q. faginea*, seguida das espécies *Q. nigra*, *Q. suber* e *Q. ilex*.

Simón et al. (1996) investigou o teor de fenólicos totais nas espécies *Q. nigra* e *Q. faginea*, tendo obtido valores mais elevados (78,5 e 89,2 mg EAG/g de extrato seco respetivamente). No entanto, este facto pode dever-se ao método usado pelos autores (análise por HPLC), pois difere do usado nos resultados obtidos. Porém, a relação entre as espécies é igual tanto nos teores obtidos pelos autores como nos representados na Tabela 9, isto é, a espécie *Q. nigra* apresenta menor riqueza em compostos fenólicos do que a espécie *Q. faginea*.

Os resultados obtidos demonstram que a concentração total de polifenóis nas bolotas varia bastante de acordo com a espécie. De uma maneira geral, o miolo contém maiores teores destes compostos, com a exceção da espécie *Q. nigra*, cuja casca apresentou valores superiores. Uma vez mais, a espécie *Q. ilex* mostrou ser a espécie com menor concentração de bioativos, porém, a distribuição dos mesmos, tanto no miolo como na casca, é mais homogénea. Estas variações podem estar relacionadas com as condições ambientais do local de origem e da época de colheita (Tejerina et al., 2011) além da genética.

Os resultados mostraram-se concordantes com os descritos por Custódio et al. (2015), num estudo realizado em *Q. suber*. Os elevados valores de compostos fenólicos principalmente nas espécies *Q. suber*, *Q. faginea* e *Q. nigra* permitem antever uma boa atividade antioxidante.

3.3.3 Determinação da atividade antioxidante

Os compostos bioativos, de natureza antioxidante, naturalmente presentes nos alimentos e subprodutos, têm despertado interesse devido aos efeitos benéficos na saúde e bem-estar dos seus consumidores. O processo respiratório e diversas reações oxidativas das células aeróbias formam radicais livres, os quais contribuem para o aparecimento e desenvolvimento de muitas doenças. As células humanas dependem da sua capacidade antioxidante para fornecer proteção contra os efeitos prejudiciais dos radicais livres e das espécies reativas de oxigénio, que são consequências inevitáveis da vida aeróbia. Muitos autores apontam para uma relação positiva entre o teor de bioativos e a atividade antioxidante. Foram desenvolvidos vários métodos para medir a capacidade antioxidante. As suas vantagens e desvantagens têm vindo a ser discutidas em termos de simplicidade, instrumentação necessária, mecanismos, método de quantificação e

relevância biológica (Niki, 2010). Frequentemente recorre-se à espectrofotometria UV/Vis convencional para avaliar a capacidade dos antioxidantes para a captação de radicais livres (Niki, 2010). Por esse motivo, torna-se evidente realizar a determinação da atividade antioxidante por diferentes metodologias. Neste trabalho foram realizados dois métodos colorimétricos, DPPH* e FRAP.

Os resultados da análise da atividade antioxidante estão apresentados na Tabela 10 e expressos em % de inibição do radical DPPH e em equivalentes de sulfato ferroso ($\mu\text{mol/ESF}$)/g de amostra para o método FRAP.

Tabela 10 – Resultados das atividades antioxidantes das espécies de *Quercus* estudadas.

Amostra		% Inibição do DPPH*	FRAP
<i>Q. suber</i>	Fruto inteiro	68,51 \pm 1,64	585,42 \pm 3,68
	Miolo	79,64 \pm 2,01	777,08 \pm 6,14
	Casca	42,35 \pm 1,21	671,25 \pm 13,35
<i>Q. faginea</i>	Fruto inteiro	74,98 \pm 0,86	1163,75 \pm 4,08
	Miolo	74,22 \pm 2,36	844,58 \pm 1,42
	Casca	57,65 \pm 1,53	458,75 \pm 5,14
<i>Q. nigra</i>	Fruto inteiro	69,35 \pm 0,35	680,42 \pm 4,45
	Miolo	77,14 \pm 0,59	717,08 \pm 2,70
	Casca	73,59 \pm 0,78	841,25 \pm 3,12
<i>Q. ilex</i>	Fruto inteiro	41,44 \pm 0,30	556,25 \pm 1,18
	Miolo	48,05 \pm 0,49	1011,25 \pm 13,59
	Casca	34,20 \pm 0,20	346,25 \pm 7,07

Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3)

Pelos resultados obtidos, verifica-se uma relação direta entre a matriz estudada, o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante. Os extratos hidroalcoólicos do miolo das bolotas de todas as espécies apresentaram maior atividade antioxidante em ambos os métodos, seguidos do fruto inteiro e casca, respetivamente. No entanto, a espécie *Q. nigra* revelou maior atividade antioxidante nos extratos obtidos da casca do que do fruto inteiro, no ensaio de FRAP.

Pela análise das atividades antioxidantes baseadas nos resultados obtidos pelo método de DPPH*, poucas diferenças foram observadas entre as espécies *Q. suber*, *Q. faginea* e *Q. nigra*. A espécie *Q. ilex* apresentou uma atividade antioxidante mais baixa, embora no miolo os valores se tenham mantido superiores aos da casca (48% e 34%,

respetivamente). Estes valores foram concordantes a outros previamente descritos por Santos et al. (2010 e 2013) e Cantos et al. (2003).

A capacidade dos extratos das bolotas para reduzir iões de ferro foi determinado usando o ensaio de FRAP. Este ensaio mede a redução do ião férrico (Fe^{3+}) a ferro ferroso (Fe^{2+}) na presença de antioxidantes.

A análise dos frutos inteiros demonstrou valores de FRAP elevados. A espécie com valor mais elevado foi a espécie *Q. faginea* (1163,75 $\mu\text{mol/g}$ extrato seco), que se destacou face às outras espécies. As restantes espécies contêm valores compreendidos entre os 556,25 $\mu\text{mol/g}$ extrato seco e os 680,42 $\mu\text{mol/g}$ extrato seco, correspondendo o menor valor, uma vez mais, à espécie *Q. ilex*.

É possível encontrar semelhanças entre os valores obtidos e os valores reportados por Rubio-Wilhelmi et al. (2008). Estes autores relataram valores entre 572,5 $\mu\text{mol/g}$ e 845,0 $\mu\text{mol/g}$ para a espécie *Q. suber* e de 768,7 $\mu\text{mol/g}$ a 970,6 $\mu\text{mol/g}$ na espécie *Q. ilex*.

O miolo da espécie *Q. ilex* apresentou valores de FRAP superiores a todas as outras amostras (1011,25 $\mu\text{mol/mg}$ extrato seco), seguida do miolo da espécie *Q. faginea* (844,58 $\mu\text{mol/mg}$ extrato seco). Contrariamente, nas cascas foi observado um comportamento diferente, ou seja, menor valor na espécie *Q. ilex* (346,25 $\mu\text{mol / mg}$) e maior valor na espécie *Q. nigra* (841,25 $\mu\text{mol/mg}$).

Face ao exposto, torna-se evidente o recurso a diferentes métodos para a avaliação da atividade antioxidante. Os métodos indiretos, estão atualmente bem desenvolvidos e são adequados, de fácil manipulação e apesar de não apresentarem a mesma especificidade, também permitem uma avaliação da atividade antioxidante adequada. No entanto, pode-se sugerir uma análise mais exaustiva, através de uma correlação entre os resultados obtidos pelos métodos indiretos e os resultados obtidos por métodos diretos, de forma a garantir uma maior segurança analítica dos resultados obtidos em ensaios antioxidantes.

3.4 Correlação entre os compostos bioativos e a atividade antioxidante

De modo a relacionar os resultados obtidos efetuou-se uma correlação de atividades. As seguintes figuras apresentam os valores da correlação de Pearson (R^2) obtidos para os vários ensaios efetuados, analisando todas as amostras (fruto inteiro, miolo e casca).

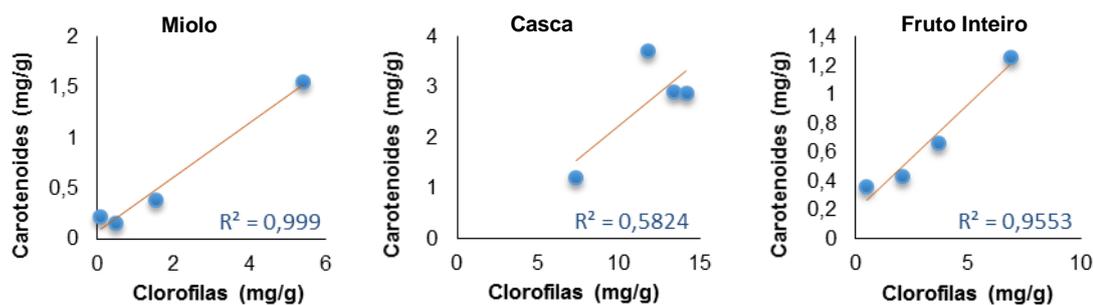


Figura 10 – Correlação entre as clorofilas (mg/g) e os carotenoides (mg/g).

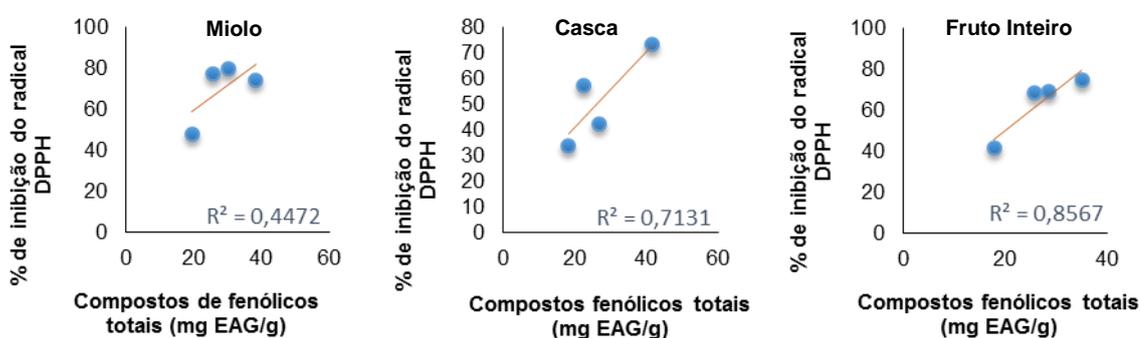


Figura 11 – Correlação entre os compostos fenólicos totais (mg EAG/g) e a % de inibição do radical DPPH.

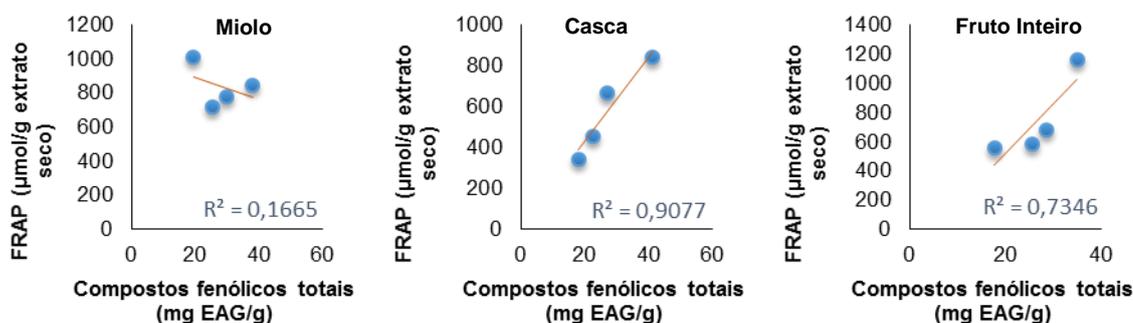


Figura 12 – Correlação entre os compostos fenólicos totais (mg EAG/g) e o FRAP ($\mu\text{mol/g}$ extracto seco).

Pela análise da Figura 10 verificou-se uma correlação positiva entre as clorofilas e os carotenoides, sendo que no miolo verifica-se uma maior correlação ($R^2 = 0,999$), seguida do fruto inteiro ($R^2 = 0,9553$) e da casca ($R^2 = 0,5824$). Relativamente às Figuras 11 e 12, as correlações obtidas entre os compostos fenólicos presentes nas diferentes amostras e a atividade antioxidante (DPPH \cdot e FRAP) foram muito divergentes.

4. Conclusão

O trabalho realizado teve como fundamento a valorização do miolo e da casca de bolotas, visando uma possível reutilização. Em análise estiveram também quatro espécies, de modo a determinar diferenças nos seus valores nutricionais e de compostos bioativos.

O valor nutricional desta matriz alimentar, teor proteico, hidratos de carbono, dos quais maioritariamente fibra dietética, baixo teor em gordura, bem como o teor de vitamina E e ácidos gordos, podem contribuir para uma dieta equilibrada, se consumidos regularmente. Por este motivo é difícil compreender a falta de desenvolvimento na produção e utilização das bolotas como alimento. Uma explicação pode advir do facto de estar associada a alimento para animais, nomeadamente suínos, e também por associação a situações de pobreza. Contudo, a sua introdução na dieta alimentar poderia trazer tantos ou mais benefícios, quando comparado com outros alimentos da mesma categoria.

A avaliação global deste trabalho permitiu ainda concluir que todas as amostras analisadas contém um elevado teor de compostos bioativos, neste caso compostos fenólicos, que lhes conferem uma importante ação antioxidante. Assim, são-lhes atribuídos benefícios para a saúde humana e animal.

Apesar de todas as amostras demonstrarem um elevado valor nutricional e um poder antioxidante também convincente, na maioria dos parâmetros analisados é a espécie *Quercus suber* a que mais se destacou.

Assim, a elevada qualidade desta matriz sugere que estes produtos poderão ser usados para o desenvolvimento de novos produtos pela indústria alimentar, farmacêutica e cosmética, tendo sempre como foco os três pilares da sustentabilidade.

4.1 Perspetivas de trabalho futuro

Considerando os resultados obtidos, é de todo o interesse analisar a composição em aminoácidos das espécies. Também os hidratos de carbono são uma fonte a ser explorada, de modo a confirmar a presença de elevado teor de fibra dietética.

Outros estudos sobre as espécies de *Quercus* deverão ser efetuados de forma a aprofundar e refutar as suas possíveis aplicações já referidas, e no intuito de aumentar a cadeia de valor associada a esta cultura.

5. Referências Bibliográficas

- Afazal-Raffi Z, Dodd RS, Pelleau Y. Mediterranean evergreen oak diversity: morphological and chemical variation of acorns. *Can J Bot* 1992; 70: 1459-1466.
- Aguilera JF, Nieto R, Rivera M, Garcia MA. Amino acid availability and energy value of acorn in the Iberian pig. *Livest Prod Sci* 2002; 77: 227-239.
- Almeida JAA, Marinho AAN, Baptista MÊS. Valor nutritivo da balota e da lande. II Coloquio sobre el cerdo ibérico, Spain. Badajoz; 1992.
- Al-Rousan WM, Al-Ismaïl KM, Attlee A, Shaker RR, Osaili TM. Characterization of acorn fruit oils extracted from selected Mediterranean *Quercus* species. *Grasas Aceites* 2013; 64: 554-560.
- Álvarez S, Morales R, Bejarano L, Durana. Producción de bellota en la dehesa Salmantina. XLII Reunión Científica de la SEEP, Spain. Lérida; 2002.
- Alves RC, Casal S, Alves MR, Oliveira MB. Discrimination between arabica and robusta coffee species on the basis of their tocopherol profiles. *Food Chem* 2009; 114: 295-9.
- Alves RC, Casal S, Oliveira MBPP. Tocopherols in espresso coffee: analytical method development and validation. *Food Chem* 2009; 115: 1549-55.
- Amarowicz R, Pegg R, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil J. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem* 2004; 84: 551-562.
- Andrenšek S, Simonovska B, Vovk I, Fyhrquist P, Vuorela H, Vuorela P. Antimicrobial and antioxidative enrichment of oak (*Quercus robur*) bark by rotation planar extraction using ExtraChrom. *Int J Food Microbiol* 2004; 92: 181-187.
- AOAC. Official Method of Analysis of AOAC 920.153 International (17th ed.). 2000.
- AOAC. Official Method of Analysis of AOAC 928.08 International (17th ed.). 2000.
- AOAC. Official Method of Analysis of AOAC 991.36 International (17th ed.). 2000.
- Araújo M, Alves RC, Pimentel FB, Costa ASG, Fernandes TJR, Valente LMP, et al. New approach for vitamin E extraction in rainbow trout flesh: Application in fish fed commercial and red seaweed-supplemented diets. *Eur J Lipid Sci Technol* 2015; 117: 1398-1405.

- Bainbridge DA. Acorns as food: history, use, recipes, and bibliography. Sierra Nature Prints, USA. California; 2001.
- Baiano A. Recovery of biomolecules from food wastes – A Review. *Molecules* 2014; 19: 14821-14842.
- Baiano A, Bevilacqua L, Terracone C, Contò F, del Nobile MA. Single and interactive effects of process variables on microwave-assisted and conventional extractions of antioxidants from vegetable solid wastes. *J Food Eng* 2014; 120: 135-145.
- Bajalan I, Javadian M, Zarinkoob S, Dalvand H. Antibacterial activity of the extracts of oak (*Quercus persica*) fruits. *Bull Env Pharmacol Life Sci* 2014; 3: 62-65.
- Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol* 2000; 61: 1-10.
- Barreira JCM, Ferreira ICFR, Oliveira MBPP, Pereira JA. Antioxidant potential of chestnut (*Castanea sativa* L.) and almond (*Prunus dulcis* L.) by-products. *Food Sci Technol Int* 2010; 16: 209-216.
- Barroso MF, Noronha JP, Delerue-Matos C, Oliveira MB. Flavored waters: influence of ingredients on antioxidant capacity and terpenoid profile by HS-SPME/GC-MS. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 5062-72.
- Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 1999; 299: 15-27.
- Berahou A, Auhmani A, Fdil N, Benharref A, Jana M, Gadhi CA. Antibacterial activity of *Quercus ilex* bark's extracts. *J Ethnopharmacol* 2007; 112: 426-429.
- Bettinger RL, Malhi R, McCarthy H. Central place models of acorn and mussel processing. *J Archaeol Sci* 1997; 24: 887-899.
- Bond A, Morrison-Saunders A. Re-evaluating sustainability assessment: aligning the vision and the practice. *Environ Impact Asses* 2011; 31: 1-17.
- Braga N, Rodrigues F, Oliveira MBPP. *Castanea sativa* by-products: a review on added value and sustainable application. *Nat Prod Res* 2015; 29: 1-18.

- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol* 1995; 28: 25-30.
- Bulda OV, Rassadina VV, Alekseichuk HN, Laman NA. Spectrophotometric measurement of carotenes, xanthophylls, and chlorophylls in extracts from plant seeds. *Russ J Plant Physiol* 2008; 55: 544-551.
- Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *J Clin Nutr* 2002; 56: 14-19.
- Cañellas I, Roig S, San Miguel A. Caracterización y evolución anual del valor bromatológico de las quercíneas mediterráneas. Pastos, desarrollo y conservación, Spain. Granada; 2003.
- Cantos E, Espín JC, López-Bote C, de la Hoz L, Ordóñez JA, Tomás-Barberán FA. Phenolic compounds and fatty acids from acorns (*Quercus* spp.), the main dietary constituent of free-ranged Iberian pigs. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 6248-6255.
- Carbonero MD, Fernandez P, Blasquez A, Navarro R. Evaluación de la producción y del calibre de bellotas de *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf) Samp a lo largo de un ciclo de poda: resultados de las campañas 2001-2002 y 2002-2003. XLIII Reunión Científica de la SEEP, España. Granada; 2003.
- Cartea ME, Francisco M, Soengas P, Velasco P. Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules* 2011; 16: 251-280.
- Carvalho WT, Reis RC, Velasco P, Soares MS, Bassinello PZ, Caliarri M. Características físico-químicas de extratos de arroz integral, quirera de arroz e soja. *Pesq Agropec Trop* 2011; 3: 422-429.
- Casal S, Oliveira B. Fatty acids analysis by gas chromatography (GC). 2ª ed. Taylor & Francis: Encyclopedia of Chromatography; 2007.
- Charef M, Mohamed Y, Saidi M, Stocker P. Determination of the fatty acid composition of acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* seeds growing in Algeria. *J Am Oil Chem Soc* 2008; 85: 921-924.

- Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y. Tannins and human health: A review. *Crit Ver Food Sci Nutr* 1998; 38: 421-464.
- Correia PR, Beirão-da-Costa ML. Effect of drying temperatures on starch-related functional and thermal properties of acorn flours. *J Food Sci* 2011; 76: 196-202.
- Correia PR, Leitão AE, Beirão-da-Costa ML. Effect of drying temperatures on chemical and morphological properties of acorn flours. *Int J Food Sci Technol* 2009; 44: 1729-1736.
- Correia PR, Nunes MC, Beirão-da-Costa ML. The effect of starch isolation method on physical and functional properties of Portuguese nut starches. II. *Q. rotundifolia* Lam. and *Q. suber* Lam. acorns starches. *Food Hydrocolloid* 2013; 30: 448-455.
- Costa ASG, Alves RC, Vinha AF, Barreira SVP, Nunes MA, Cunha LM, et al. Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. *Ind Crop Prod* 2014; 53: 350-357.
- Cruz BR, Abraão AS, Lemos AM, Nunes FM. Chemical composition and functional properties of native chestnut starch (*Castanea sativa* Mill.). *Carbohydr Polymers* 2013; 94: 594-602.
- Custódio L, Patarra J, Alberício F, Neng NR, Nogueira JMF, Romano A. Phenolic composition, antioxidant potential and *in vitro* inhibitory activity of leaves and acorns of *Quercus suber* on key enzymes relevant for hyperglycemia and Alzheimer's disease. *Ind Crop Prod* 2015; 64: 45–51.
- Darlington LG, Stone TW. Antioxidants and fatty acids in the amelioration of rheumatoid arthritis and related disorders. *Br J Nutr* 2001; 85: 251-269.
- De Vasconcelos M, Bennett RN, Rosa E, Ferreira-Cardoso JV. Composition of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and association with health effects: fresh and processed products. *J Sci Food Agric* 2010; 90: 1578-1589.
- Deforce K, Bastiaens J, Calster HV, Vanhoutte S. Iron age acorns from Boezing (Belgium): the role of acorn consumption in prehistory. *Archaeologisches Korrespondenzblatt* 2009; 39: 381-392.

- Eagappan K, Sasikumar S. Nutricognosy of fruits and vegetables against hypertension. Int J Biol Pharm Allied Sci 2014; 3: 309-405.
- Estévez M, Morcuende D, Ramírez R, Ventanas J, Cava R. Extensively reared Iberian pigs versus intensively reared white pigs for the manufacture of liver pate. Meat Sci 2004; 67: 453-461.
- European Commission. Sustainable Consumption and Production and Sustainable Industrial Policy Action Plan. 2008.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2012.
- FAO. Expert consultation on nutrition indicators for biodiversity. 2010.
- Ferrão JEM, Ferrão AMBC. A bolota e a glande, potencialidades em óleo e farinha. Revista de Ciências Agrárias 1988; 2: 15-29.
- Fernandes TJR, Alves RC, Souza T, Silva JMG, Castro-Cunha M, Valente LMP, et al. Lipid content and fatty acid profile of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles as affected by feed containing different amounts of plant protein. Food Chem 2012; 134: 1337-1342.
- Fernández I, Gómez A, Moreno P. Características de las bellotas de encina (*Quercus ilex*) en diferentes zonas del Valle de los Pedroches (Córdoba). Pastos y Ganadería Extensiva Gráficas Cervantes, Spain. Salamanca; 2005.
- Ferreira-Dias S, Valente DG, Abreu JMF. Pattern recognition of acorns from different *Quercus* species based on oil content and fatty acid profile. Grasas Aceites 2003; 54: 384-391.
- Ferruzzi M, Böhm V, Courtney P, Schwartz S. Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. J Food Sci 2002; 67: 2589-2595.
- Frédérich M, Marcowycz A, Cieckiewicz E, Mégalizzi V, Angenot L, Kiss R. In vitro anticancer potential of tree extracts from the Walloon region forest. Planta Med 2009; 75: 1-4.

- Galván JV, Novo JJJ, Cabrera AG, Ariza D, García-Olmo J, Cerrillo RMN. Population variability based on the morphometry and chemical composition of the acorn in Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.). *Eur J For Res* 2002; 131: 893–904.
- Gani A, Wani SM, Masoodi FA, Hameed G. Whole-grain cereal bioactive compounds and their health benefits: a review. *J Food Process Technol* 2012; 3: 146-156.
- Garrido JL, Rey PJ, Herrera CM. Fuentes de variación en el tamaño de la semilla de la herbácea perenne *Helleborus foetidus* L. (Ranunculaceae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 2005; 62: 115-125.
- Gea-Izquierdo G, Cañellas I, Montero G. Acorn production in Spanish holm oak woodlands. *Invest Agrar Sist Recur For* 2006; 15: 339-354.
- Gonçalves B, Borges O, Costa HS, Bennett S, Santos M, Silva AP. Metabolite composition of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) upon cooking: proximate analysis, fibre, organic acids and phenolics. *Food Chem* 2010; 122: 154-160.
- Grunert KG, Sophie H, Wills J. Sustainability labels on food products: consumer motivation, understanding and use. *Food Policy* 2014; 44: 177-189.
- Guimarães R, Barros L, Barreira JC, Sousa MJ, Carvalho AM, Ferreira IC. Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: grapefruit, lemon, lime and orange. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 99-106.
- Guiné R, Fernandes R, Correia P. Influencia da secagem nas propriedades químicas de castanhas. XIX Encontro Nacional da SPQ, Portugal. Coimbra; 2004.
- Gustavsson J, Cederberg C, Sonesson R, van Otterdijk R, Meybeck A. Global foodlosses and food wastes: extent, cause and prevention. Office of Knowledge Exchange, Research and Extension, FAO, Italy. Rome; 2011.
- Gutteridge JM. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun*. 1993; 19: 141-58.
- Halliwell B, Rafter J, Jenner A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, and tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 268S-276S.

- Han S, Lee J, Jeon S, Hong T, Yim DS. Mixed-effect circadian rhythm model for human erythrocyte acetylcholinesterase activity-application to the proof of concept of cholinesterase inhibition by acorn extract in healthy subjects with galantamine as positive control. *Eur J Clin Pharmacol* 2012; 68: 599-605.
- Huang WH, Davidge ST, Wu J. Bioactive Natural Constituents from Food Sources-Potential Use in Hypertension Prevention and Treatment. *Cr Rev in Food Sci* 2013; 53: 615-630.
- INE. Estatísticas Agrícolas 2013. Instituto Nacional de Estatística IP, Portugal. Lisbon; 2013.
- INSA, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Tabela da Composição de Alimentos (TCA). 2010.
- Jamnadass RH, Dawson IK, Franzel S, Leakey RRB, Mithöfer D, Akinnifesi FK, et al. Improving livelihoods and nutrition in sub-Saharan Africa through the promotion of indigenous and exotic fruit production in smallholders' agroforestry systems: A review. *Int Forest Rev* 2011; 13: 338-354.
- Jawarmeh MS, Brake MH, Muhaidat R, Migdadi HM, Lahha JN, El-Oqlah AA. Characterization of *Quercus* species distributed in Jordan using morphological and molecular markers. *Afr J Biotechnol* 2013; 12: 1326-1324.
- Jiang F, Dusting GJ. Natural phenolic compounds as cardiovascular therapeutic: potential role of their antiinflammatory effects. *Curr Vasc Pharmacol* 2003; 1: 135-156.
- Karolyi D, Salajpal K, Kiš G, Đikić M, Jurić, I. Influence of finishing diet on fatty acid profile of longissimus muscle of Black Slavonian pigs. *Poljoprivreda* 2007; 13: 176-179.
- Kasarda DD. Can an increase in celiac disease be attributed to an increase in the gluten content of wheat as a consequence of wheat breeding? *J Agric Food Chem* 2013; 61: 1155-1159.
- Kaur L, Singh N. Relationships between various functional, thermal and pasting properties of flours from different Indian black gram (*Phaseolus mungo* L.) cultivars. *J Sci Food Agric* 2007; 87: 974-984.

- Kodad O, Estopañán G, Juan T, Alonso JM, Espiau MT, Company RS. Oil content, fatty acid composition and tocopherol concentration in the Spanish almond genebank collection. *Sci Hort* 2014; 177: 99-107.
- Korus J, Witczak M, Ziobro R, Juszcak L. The influence of acorn flour on rheological properties of gluten free dough and physical characteristics of the bread. *Eur Food Res Technol* 2015; 6: 1135-1143.
- Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med* 2002; 30: 71-88.
- Lee KW, Hur HJ, Lee HJ, Lee CY. Antiproliferative effects of dietary phenolic substances and hydrogen peroxide. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 1990-1995.
- Lee SH, Kim DI, Cho SY, Jung HJ, Cho SM, Park HJ et al. Effects of acorn (*Quercus acutissima* CARR.) supplementation on the level of acetylcholine and its related enzyme activities in the brain of dementia mouse model. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2005; 34: 738-742.
- León-Camacho M, Viera-Alcaide I, Vicario IM. Acorn (*Quercus* spp.) fruit lipids: saponifiable and unsaponifiable fractions: a detailed study. *J Am Oil Chem Soc* 2004; 81: 447-453.
- Lie D. Dietary fatty acids may reduce risk of cognitive decline. *Neurology* 2004; 62: 275-280.
- Lila M. Plant pigments and human health. Plant pigments and their manipulation, UK. Oxford; 2004.
- Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr* 2004; 3479- 3485.
- Livingstone K, Givens D, Cockcroft J, Pickering J, Lovegrove J. Is fatty acid intake a predictor of arterial stiffness and blood pressure in men? Evidence from the caerphilly prospective study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013; 23: 1079-1085.

- López-Carrasco C, Daza A, Rey A, López-Bote C. Efectos de las heladas y los carpófagos (*Curculio* sp.) sobre la calidad de bellotas en una dehesa de Castilla-La Mancha. XLIV Reunión Científica de la SEEP, Spain. Salamanca; 2004.
- Lopes IMG, Bernardo-Gil MG. Characterization of acorn oils extracted by hexane and by supercritical carbon dioxide. *Eur J Lipid Sci Technol* 2005; 107: 12-19.
- MacDonald-Wicks LK, Wood LG, Garg ML. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J Sci Food Agric* 2006; 86: 2046-2056.
- Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JL. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta* 2008; 613: 1-19.
- Martinson K, Hovda L, Murphy M, Weicherding P. *Plants Poisonous or Harmful to Horses in the North Central United States*. Minnesota: University of Minnesota Extension; 2007.
- Matos ME, Rosell CM. Quality indicators of rice-based gluten-free bread-like products: relationships between dough rheology and quality characteristics. *Food Bioprocess Tech* 2013; 6: 2331-2341.
- Matos ME, Rosell CM. Understanding gluten-free dough for reaching breads with physical quality and nutritional balance. *J Sci Food Agr* 2015; 95: 653-661.
- Moo-Huchin VM, Moo-Huchin MI, Estrada-León RJ, Cuevas-Glory L, Estrada-Mota IA, Ortiz-Vásquez E, et al. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chem* 2015; 166: 17-22.
- Morais EC, Cruz AG, Bolini HMA. Gluten-free bread: multiple time-intensity analysis, physical characterisation and acceptance test. *Int J Food Sci Technol* 2013; 48: 2176-2184.
- Moure A, Conde E, Falqué E, Domínguez H, Parajó JC. Production of nutraceuticals from chestnut burs by hydrolytic treatment. *Food Rev Int* 2014. *in press*.

- Nagata M, Yamashita I. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *J Jpn Soc Food Sci* 1992; 39: 925-928.
- Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry* 4^a ed; 2005.
- Niki E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 503-515.
- Nourafcan H, Nasrollahpour M, Bajalan I. Antibacterial activity of leaves extract from oak (*Quercus persica*) against some positive and negative bacteria. *Int J Farm Allied Sci* 2013; 2: 1153-1155.
- Ofcarcik RP, Burns EE, Teer JG. Acorns for Human food. *Food Ind J* 1971; 4: 18.
- Oh YS, Jun HS. Role of bioactive food components in diabetes prevention: effects on beta-cell function and preservation. *Nutr Metab Insights* 2014; 7: 51–59.
- Oosterveer P, Adjei BE, Vellema S, Slingerland M. Global sustainability standards and food security: exploring unintended effects of voluntary certification in palm oil. *Global Food Security* 2014; 3: 220-226.
- O'Shea N, Arendt E, Gallagher E. State of the art in gluten- free research. *J Food Sci* 2014; 79: 1067-1076.
- Özcan T. Characterization of Turkish *Quercus* L. taxa based on fatty acid compositions of the acorns. *J Am Oil Chem Soc* 2007; 84: 653-662.
- Özcan T, Baycu G. Some elemental concentrations in the acorns of Turkish *Quercus* L. (*Fagaceae*) taxa. *Pak J Bot* 2005; 37: 361-371.
- Papandreou D, Noor ZT, Rashed M. The role of soluble, insoluble fibers and their bioactive compounds in cancer: a mini review. *Food Nutr Sci* 2015; 6: 1-11.
- Pastor-Villaescusa B, Rangel-Huerta OD, Aguilera CM, Gil A. A systematic review of the efficacy of bioactive compounds in cardiovascular disease: carbohydrates, active lipids and nitrogen compounds. *Ann Nutr Metab* 2015; 66: 168-181.

- Pereira SE. Caracterização da pele de prata no contexto da valorização de subprodutos da indústria agro-alimentar [dissertação] Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2012.
- Pérez V, Doce RR, García-Pariente C, Hervás G, Carmen Ferreras M, Mantecón AR, et al. Oak leaf (*Quercus pyrenaica*) poisoning in cattle. *Res Vet Sci* 2011; 91: 269-277.
- Petrović S, Šobajić S, Rakić S, Tomić A, Kukić J. Investigation of kernel oils of *Quercus robur* and *Quercus cerris*. *Chem Nat Compd* 2004; 40: 420-422.
- Pio R, Bueno SCS, Maro LAC, Bueno JPS, Assis CN. Época de maturação, caracterização física e química de cultivares e seleções de castanheiro. *Rev Bras Frutic* 2014; 3: 525- 531.
- Pinent M, Castell A, Baiges I, Montagut G, Arola L, Anna Ardévol A. Bioactivity of flavonoids on insulin-secreting cells. *Compr Rev Food Sci F* 2008; 7: 299-308.
- Plumlee KH, Johnson B, Galey FD. Comparison of disease in calves dosed orally with oak or commercial tannic acid. *J Vet Diagn Invest* 1998; 10: 263-267.
- Pongjaruvat W, Methacanon P, Seetapan N, Fuongfuchat A, Gamonpilas C. Influence of pregelatinised tapioca starch and transglutaminase on dough rheology and quality of gluten free jasmine rice breads. *Food Hydrocolloid* 2014; 36: 143-150.
- Popović BM, Štajner D, Ždero R, Orlović S, Galić Z. Antioxidant characterization of oak extracts combining spectrophotometric assays and chemometrics. *Sci World J* 2013; 1-8.
- Porrás CJ. Efecto de la poda de la encina (*Quercus rotundifolia* Lam.) en los aspectos de producción y en el del grosor de las bellotas. XXXVIII Reunión Científica de la SEEP, Spain. Soria; 1998.
- Powell B, Hall J, Johns T. Forest cover, use and dietary intake in the East Usambara Mountains, Tanzania. *Int Forest Rev* 2011; 13: 305-324.
- Pritchard HW, Daws MI, Fletcher BJ, Gamene CS, Msanga HP, Omondi W. Ecological correlates of seed desiccation tolerance in tropical African dryland trees. *Am J Bot* 2004; 91: 863-870.

- Rababah T, Ereifej K, Al-Mahasneh M, Alhamad M, Alrababah M, Al-u'datt M. The physicochemical composition of acorns for two Mediterranean *Quercus* species. *J Agr Sci* 2008; 4: 131-137.
- Rakić S, Petrović S, Kukić J, Jadranin M, Tešević V, Povrenović D, et al. Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. *Food Chem* 2007; 104: 830-834.
- Rakić S, Povrenović D, Tešević V, Simić M, Maletić R. Oak acorn, polyphenols and antioxidant activity in functional food. *J Food Eng* 2006; 74: 416-423.
- Ramírez-Valiente J, Valladares F, Gil L, Aranda I. Population differences in juvenile survival under increasing drought are mediated by seed size in cork oak (*Quercus suber* L.). *For Ecol Manage* 2009; 257: 1676-1683.
- Ramos S. Biología reproductiva de una masa de alcornoque (*Q. Suber* L.) en el sur deBadajoz [tesis doctoral]. Badajoz: Universidad De Extremadura; 2002.
- Rangel-Huerta OD, Pastor-Villaescusa B, Aguilera CM, Gil A. Systematic review of the efficacy of bioactive compounds in cardiovascular disease: phenolic compounds. *Nutrients* 2015; 29: 5177-5216.
- Rashid RMS, Sabir DA, Hawramee OK. Effect of sweet acorn flour of common oak (*Quercus aegilops* L.) on locally Iraqi pastry (kulicha) products. *J Zankoy Sulaimani* 2014; 16: 244-249.
- Reisch L, Eberle U, Lorek S. Sustainable food consumption: an overview of contemporary issues and policies. *Sustain Sci Pract Policy* 2013; 9: 7-25.
- Rodrigues A, Emeje M. Recent applications of starch derivates in nanodrug delivery. *Carbohydr Polymers* 2012; 87: 987-994.
- Rodrigues M, Souza A, Lima J, Moura C, Geraldine R. Cinética da degradação de carotenoides e da alteração de cor do azeite de pequi submetido ao aquecimento em temperatura de fritura. *Cienc Rural* 2013; 43: 1509-1515.
- Rodriguez-Estévez V, Martínez AG, Moreno CM, Muñoz JMP, Castro AGG. Dimensiones y características nutritivas de las bellotas de los *Quercus* de la dehesa. *Arch Zootec* 2008; 57: 1–12.

- Rosenberg D. The possible use of acorns in past economies of the southern levant: a staple food or a negligible food source?. *Levant* 2008; 40: 167-175.
- Rubio-Wilhelmi MM, Rosales MA, Cervilla LM, Blasco B, Rios JJ, Sánchez-Rodríguez E, et al. Variation of stress indicators in *Quercus* species grown at different areas in Spain. *Curr Top Plant Biol* 2008; 9: 135-145.
- Sánchez-Burgos JA, Ramírez-Mares MV, Larrosa MM, Gallegos-Infante JA., González-Laredo RF, Medina-Torres L, et al. Antioxidant, antimicrobial, antitopoisomerase and gastroprotective effect of herbal infusions from four *Quercus* species. *Ind Crop Prod* 2013; 42: 57-62.
- Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J, López-Hernández J, Paseiro-Losada P, Simal-Lozano J. Determination of uronic acid composition of seaweed dietary fibre by HPLC. *Biomed Chromatogr* 2004; 18: 139-166.
- Santos SAO, Pinto PCRO, Silvestre AJD, Neto CP. Chemical composition and antioxidant activity of phenolic extracts of cork from *Quercus suber* L. *Ind Crop Prod* 2010; 31: 521-526.
- Santos SAO, Villaverde JJ, Sousa AF, Coelho JFJ, Neto CP, Silvestre AJD. Phenolic composition and antioxidant activity of industrial cork by-products. *Ind Crop Prod* 2013; 47: 262-269.
- Santha NC, Ackman RG. Nervonic acid versus tricosanoic acid as internal standards in quantitative gas chromatographic analyses of fish oil longer-chain n-3 polyunsaturated fatty acid methyl esters. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1990; 533: 1-10.
- Sciban M, Klasnja M, Antov M, Skrbic B. Removal of water turbidity by natural coagulants obtained from chestnut and acorn. *Bioresour Technol* 2009; 100: 6639-6643.
- Senthilkumar K, Kim SK. Marine Invertebrate Natural Products for Anti-Inflammatory and Chronic Diseases. *J Evid Based Complementary Altern Med* 2013; 1-10.
- Sibbel A. The sustainability of functional foods. *Soc Sci Med* 2007; 64: 554-61.

- Silva JP, Gomes AC, Coutinho OP. Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells. *Eur J Pharmacol* 2008; 601; 50-60.
- Silva K, Vieira E, Fialho J, Carvalho L, Silva M. Potencial agronómico e teor de carotenoides em raízes de reserva de mandioca. *Cienc Rural* 2014; 44: 1348-1354.
- Simón BF, Cadahía E, Conde E, García-Vallejo MC. Low molecular weight phenolic compounds in Spanish oak woods. *J Agric Food Chem* 1996; 44; 1507-1511.
- Smith S, Naylor RJ, Knowles EJ, Mair TS, Cahalan SD, Fewes D, et al. Suspected acorn toxicity in nine horses. *Equine Vet J* 2014; *in press*.
- Souza C, Menezes J, Neto D, Assis J, Silva S, Druzian J. Carotenoides totais e vitamina A de cucurbitáceas do banco ativo de germoplasma da embrapa semiárido. *Cienc Rural* 2012; 42: 926-933.
- Sourki HA, Mahdavian-Mehr H, Pourfarzad A, Sedaghat N. Optimization of alkaline extraction for dietary fiber of coffee silver skin and its effect on the quality and shelf life of Iranian Barbari bread. *Iran. J Nutr Sci Food Technol* 2013; 8: 11-22.
- Spier SJ, Smith BP, Seawright AA, Norman BB, Ostrowski SR, Oliver MN. Oak toxicosis in cattle in northern California: Clinical and pathologic findings. *J Am Vet Med Assoc* 1987; 191: 958-964.
- Spiertz H. Food production, crops and sustainability: restoring confidence in science and technology. *Curr Opin Env Sust* 2010; 2: 439-443.
- Stohs SJ. The role of free radicals in toxicity and disease. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 1995; 6: 205-28.
- Tejerina D, García-Torres S, Vaca MC, Vásquez FM, Cava R. Acorns (*Quercus rotundifolia* Lam.) and grass as natural sources of antioxidants and fatty acids in the “montanera” feeding of Iberian pig: intra- and inter-annual variations. *Food Chem* 2011; 124: 997-1004.
- Torbica A, Hadnađev M, Dapčević T. Rheological, textural and sensory properties of gluten-free bread formulations based on rice and buckwheat flour. *Food Hydrocolloid* 2010; 24: 626-632.

- Toori MA, Mirzaei M, Mirzaei N, Lamrood P, Mirzaei A. Antioxidant and hepatoprotective effects of the internal layer of oak fruti (Jaft). *J Med Plants Res* 2013; 7: 24-28.
- Tree names. Oak Tree Types and Species Names of the *Quercus* Genus. Disponível em http://www.treenames.net/ti/quercus/oak_trees.html [acedido em 27/06/2015]
- Uddin G, Rauf A. Phytochemical screening, antimicrobial and antioxidant activities of aerial parts of *Quercus robur* L. *Middle-East J Med PI Res* 2012; 1: 1-4.
- Ullah MF, Khan MW. Food as medicine: Potential therapeutic tendencies of plant derived polyphenolic compounds. *Asian Pac J Cancer Prev* 2008; 9: 187-196.
- UNEP. Millennium ecosystem assessment, synthesis report: ecosystems and human well-being: general synthesis. 2005.
- Vinceti B, Termote C, Ickowitz A, Powel B, Kehlenbeck K, Hunter D. The contribution of forests and trees to sustainable diets. *J Sustain* 2013; 5: 4797-4824.
- Watson L, Dallwitz MJ. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval 2000; *in press*.
- WCED. Our common future: report of the World Commission on Environment and Development. 1987.
- Wognum PM, Bremmers H, Trienekens J, Vorst J, Bloemhof J. Systems for sustainability and transparency of food supply chains - Current status and challenges. *Adv Eng Inform* 2011; 25: 65-76.
- World Summit on Food Security (WSFS). Declaration of the World Summit on Food Security. 2009.
- Yarani R, Mansouri K, Mohammadi-Motlagh HR, Mahnam A, Emami-Aleagha MS. In vitro inhibition of angiogenesis by hydroalcoholic extract of oak (*Quercus infectoria*) acorn shell via suppressing VEGF, MMP-2, and MMP-9 secretion. *Pharm Biol* 2013; 51: 361-368.
- Yeh CT, Ching LC, Yen GC. Inducing gene expression of cardiac antioxidant enzymes by dietary phenolic acids in rats. *J Nutr Biochem* 2009; 20: 163-171.

Yoshida Y, Niki E, Noguchi N. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chem Phys Lipids* 2003; 123: 63-75.

Żyżelewicz D, Krysiak W, Budryn G, Oracz J, Nebesny E. Tocopherols in cocoa butter obtained from cocoa bean roasted in different forms and under various process parameters. *Food Res Int* 2014; 63: 390-399.