

VOL X

AGRÁRIAS

PESQUISA E INOVAÇÃO NAS CIÊNCIAS QUE
ALIMENTAM O MUNDO

EDUARDO EUGÊNIO
SPERS
(Organizador)

 EDITORA
ARTEMIS

2023

VOL X

AGRÁRIAS

PESQUISA E INOVAÇÃO NAS CIÊNCIAS QUE
ALIMENTAM O MUNDO

EDUARDO EUGÊNIO
SPERS
(Organizador)

 EDITORA
ARTEMIS

2023



O conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons Atribuição-Não-Comercial NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0). Direitos para esta edição cedidos à Editora Artemis pelos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento, desde que sejam atribuídos créditos aos autores, e sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

A responsabilidade pelo conteúdo dos artigos e seus dados, em sua forma, correção e confiabilidade é exclusiva dos autores. A Editora Artemis, em seu compromisso de manter e aperfeiçoar a qualidade e confiabilidade dos trabalhos que publica, conduz a avaliação cega pelos pares de todos manuscritos publicados, com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

Editora Chefe	Prof. ^a Dr. ^a Antonella Carvalho de Oliveira
Editora Executiva	M. ^a Viviane Carvalho Mocellin
Direção de Arte	M. ^a Bruna Bejarano
Diagramação	Elisangela Abreu
Organizador	Prof. Dr. Eduardo Eugênio Spers
Imagem da Capa	Shutterstock
Bibliotecário	Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

Conselho Editorial

Prof.^a Dr.^a Ada Esther Portero Ricol, *Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”*, Cuba
Prof. Dr. Adalberto de Paula Paranhos, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil
Prof. Dr. Agustín Olmos Cruz, *Universidad Autónoma del Estado de México*, México
Prof.^a Dr.^a Amanda Ramalho de Freitas Brito, Universidade Federal da Paraíba, Brasil
Prof.^a Dr.^a Ana Clara Monteverde, *Universidad de Buenos Aires*, Argentina
Prof.^a Dr.^a Ana Júlia Viamonte, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Portugal
Prof. Dr. Ángel Mujica Sánchez, *Universidad Nacional del Altiplano*, Peru
Prof.^a Dr.^a Angela Ester Mallmann Centenaro, Universidade do Estado de Mato Grosso, Brasil
Prof.^a Dr.^a Begoña Blandón González, *Universidad de Sevilla*, Espanha
Prof.^a Dr.^a Carmen Pimentel, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil
Prof.^a Dr.^a Catarina Castro, Universidade Nova de Lisboa, Portugal
Prof.^a Dr.^a Cirila Cervera Delgado, *Universidad de Guanajuato*, México
Prof.^a Dr.^a Cláudia Neves, Universidade Aberta de Portugal
Prof.^a Dr.^a Cláudia Padovesi Fonseca, Universidade de Brasília-DF, Brasil
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos, Universidade Federal da Grande Dourados, Brasil
Prof. Dr. David García-Martul, *Universidad Rey Juan Carlos de Madrid*, Espanha
Prof.^a Dr.^a Deuzimar Costa Serra, Universidade Estadual do Maranhão, Brasil
Prof.^a Dr.^a Dina Maria Martins Ferreira, Universidade Estadual do Ceará, Brasil
Prof.^a Dr.^a Edith Luévano-Hipólito, *Universidad Autónoma de Nuevo León*, México
Prof.^a Dr.^a Eduarda Maria Rocha Teles de Castro Coelho, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal
Prof. Dr. Eduardo Eugênio Spers, Universidade de São Paulo (USP), Brasil
Prof. Dr. Eloi Martins Senhoras, Universidade Federal de Roraima, Brasil
Prof.^a Dr.^a Elvira Laura Hernández Carballido, *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*, México



Prof.ª Dr.ª Emilas Darlene Carmen Lebus, *Universidad Nacional del Nordeste/ Universidad Tecnológica Nacional, Argentina*
Prof.ª Dr.ª Erla Mariela Morales Morgado, *Universidad de Salamanca, Espanha*
Prof. Dr. Ernesto Cristina, *Universidad de la República, Uruguay*
Prof. Dr. Ernesto Ramírez-Briones, *Universidad de Guadalajara, México*
Prof. Dr. Fernando Hitt, *Université du Québec à Montréal, Canadá*
Prof. Dr. Gabriel Díaz Cobos, *Universitat de Barcelona, Espanha*
Prof.ª Dr.ª Gabriela Gonçalves, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Portugal
Prof. Dr. Geoffroy Roger Pointner Malpass, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Brasil
Prof.ª Dr.ª Gladys Esther Leoz, *Universidad Nacional de San Luis, Argentina*
Prof.ª Dr.ª Glória Beatriz Álvarez, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*
Prof. Dr. Gonçalo Poeta Fernandes, Instituto Politécnico da Guarda, Portugal
Prof. Dr. Gustavo Adolfo Juarez, *Universidad Nacional de Catamarca, Argentina*
Prof. Dr. Håkan Karlsson, *University of Gothenburg, Suécia*
Prof.ª Dr.ª Iara Lúcia Tescarollo Dias, Universidade São Francisco, Brasil
Prof.ª Dr.ª Isabel del Rosario Chiyon Carrasco, *Universidad de Piura, Peru*
Prof.ª Dr.ª Isabel Yohena, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*
Prof. Dr. Ivan Amaro, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil
Prof. Dr. Iván Ramon Sánchez Soto, *Universidad del Bío-Bío, Chile*
Prof.ª Dr.ª Ivânia Maria Carneiro Vieira, Universidade Federal do Amazonas, Brasil
Prof. Me. Javier Antonio Albornoz, *University of Miami and Miami Dade College, Estados Unidos*
Prof. Dr. Jesús Montero Martínez, *Universidad de Castilla - La Mancha, Espanha*
Prof. Dr. João Manuel Pereira Ramalho Serrano, Universidade de Évora, Portugal
Prof. Dr. Joaquim Júlio Almeida Júnior, UniFIMES - Centro Universitário de Mineiros, Brasil
Prof. Dr. Jorge Ernesto Bartolucci, *Universidad Nacional Autónoma de México, México*
Prof. Dr. José Cortez Godínez, Universidad Autónoma de Baja California, México
Prof. Dr. Juan Carlos Cancino Diaz, Instituto Politécnico Nacional, México
Prof. Dr. Juan Carlos Mosquera Feijoo, *Universidad Politécnica de Madrid, Espanha*
Prof. Dr. Juan Diego Parra Valencia, *Instituto Tecnológico Metropolitano de Medellín, Colômbia*
Prof. Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez, *Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México*
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil
Prof. Dr. Leinig Antonio Perazolli, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil
Prof.ª Dr.ª Livia do Carmo, Universidade Federal de Goiás, Brasil
Prof.ª Dr.ª Luciane Spanhol Bordignon, Universidade de Passo Fundo, Brasil
Prof. Dr. Luis Fernando González Beltrán, *Universidad Nacional Autónoma de México, México*
Prof. Dr. Luis Vicente Amador Muñoz, *Universidad Pablo de Olavide, Espanha*
Prof.ª Dr.ª Macarena Esteban Ibáñez, *Universidad Pablo de Olavide, Espanha*
Prof. Dr. Manuel Ramiro Rodríguez, *Universidad Santiago de Compostela, Espanha*
Prof.ª Dr.ª Márcia de Souza Luz Freitas, Universidade Federal de Itajubá, Brasil
Prof. Dr. Marcos Augusto de Lima Nobre, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil
Prof. Dr. Marcos Vinicius Meiado, Universidade Federal de Sergipe, Brasil
Prof.ª Dr.ª Mar Garrido Román, *Universidad de Granada, Espanha*
Prof.ª Dr.ª Margarida Márcia Fernandes Lima, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil
Prof.ª Dr.ª María Alejandra Arecco, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*
Prof.ª Dr.ª Maria Aparecida José de Oliveira, Universidade Federal da Bahia, Brasil
Prof.ª Dr.ª Maria Carmen Pastor, *Universitat Jaume I, Espanha*
Prof.ª Dr.ª Maria do Céu Caetano, Universidade Nova de Lisboa, Portugal
Prof.ª Dr.ª Maria do Socorro Saraiva Pinheiro, Universidade Federal do Maranhão, Brasil
Prof.ª Dr.ª Maria Gracinda Carvalho Teixeira, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil



Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Pato, Instituto Politécnico de Viseu, Portugal
Prof.ª Dr.ª Maritza González Moreno, *Universidad Tecnológica de La Habana, Cuba*
Prof.ª Dr.ª Mauriceia Silva de Paula Vieira, Universidade Federal de Lavras, Brasil
Prof.ª Dr.ª Ninfa María Rosas-García, Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional, México
Prof.ª Dr.ª Odara Horta Boscolo, Universidade Federal Fluminense, Brasil
Prof. Dr. Osbaldo Turpo-Gebera, *Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Peru*
Prof.ª Dr.ª Patrícia Vasconcelos Almeida, Universidade Federal de Lavras, Brasil
Prof.ª Dr.ª Paula Arcoverde Cavalcanti, Universidade do Estado da Bahia, Brasil
Prof. Dr. Rodrigo Marques de Almeida Guerra, Universidade Federal do Pará, Brasil
Prof. Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares, Universidade Federal do Piauí, Brasil
Prof. Dr. Sergio Bitencourt Araújo Barros, Universidade Federal do Piauí, Brasil
Prof. Dr. Sérgio Luiz do Amaral Moretti, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil
Prof.ª Dr.ª Silvia Inés del Valle Navarro, *Universidad Nacional de Catamarca, Argentina*
Prof.ª Dr.ª Solange Kazumi Sakata, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)- USP, Brasil
Prof.ª Dr.ª Stanislava Kashtanova, *Saint Petersburg State University, Russia*
Prof.ª Dr.ª Teresa Cardoso, Universidade Aberta de Portugal
Prof.ª Dr.ª Teresa Monteiro Seixas, Universidade do Porto, Portugal
Prof. Dr. Valter Machado da Fonseca, Universidade Federal de Viçosa, Brasil
Prof.ª Dr.ª Vanessa Bordin Viera, Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
Prof.ª Dr.ª Vera Lúcia Vasilévski dos Santos Araújo, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil
Prof. Dr. Wilson Noé Garcés Aguilar, *Corporación Universitaria Autónoma del Cauca, Colômbia*
Prof. Dr. Xosé Somoza Medina, *Universidad de León, Espanha*

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

A277 Agrárias [livro eletrônico] : pesquisa e inovação nas ciências que alimentam o mundo X / Organizador Eduardo Eugênio Spers. – Curitiba, PR: Artemis, 2023.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

Edição bilíngue

ISBN 978-65-81701-05-5

DOI 10.37572/EdArt_301123055

1. Ciências agrárias – Pesquisa. 2. Agronegócio. 3. Sustentabilidade.
I. Spers, Eduardo Eugênio.

CDD 630

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422



APRESENTAÇÃO

As Ciências Agrárias são um campo de estudo multidisciplinar por excelência, e um dos mais profícuos em termos de pesquisas e aprimoramento técnico. A demanda mundial por alimentos e a crescente degradação ambiental impulsionam a busca constante por soluções sustentáveis de produção e por medidas visando à preservação e recuperação dos recursos naturais.

A obra **Agrárias: Pesquisa e Inovação nas Ciências que Alimentam o Mundo** compila pesquisas atuais e extremamente relevantes, apresentadas em linguagem científica de fácil entendimento. Na coletânea, o leitor encontrará textos que tratam dos sistemas produtivos em seus diversos aspectos, além de estudos que exploram diferentes perspectivas ou abordagens sobre a planta, o meio ambiente, o animal, o homem e a sociedade no ambiente rural.

É uma obra que fornece dados, informações e resultados de pesquisas tanto para pesquisadores e atuantes nas diversas áreas das Ciências Agrárias, como para o leitor que tenha a curiosidade de entender e expandir seus conhecimentos.

Este Volume X traz 14 trabalhos de estudiosos de diversos países, divididos em dois eixos temáticos: *Produtividade e eficiência na produção vegetal* e *Sustentabilidade e reaproveitamento produtivo*.

Desejo a todos uma ótima leitura!

Eduardo Eugênio Spers

SUMÁRIO

PRODUTIVIDADE E EFICIÊNCIA NA PRODUÇÃO VEGETAL

CAPÍTULO 1..... 1

HIDROGELES DE QUITOSANO Y POLIACRILAMIDA SOBRE LAS PROPIEDADES EDÁFICAS Y EL CRECIMIENTO DE *Lupinus exaltatus*

Néstor Gutiérrez Pérez

Elizabeth García Gallegos

Oscar Gumersindo Vázquez Cuecuecha

Elizabeth Hernández Acosta

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3011230551

CAPÍTULO 2..... 10

FERTILIZANTE DE LENTA LIBERACIÓN COMPLEMENTARIO AL FERTIRRIEGO Y SU EFECTO EN PRODUCCIÓN DE LIMA MEXICANA

José C. García-Preciado

Silvia H. Carrillo Medrano

Miguel A. Manzanilla Ramírez

María Guzmán Martínez

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3011230552

CAPÍTULO 3..... 17

COLORIMETRIC CHARACTERISATION OF TROPICAL WOODS

José Amador Honorato-Salazar

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3011230553

CAPÍTULO 4..... 26

PANORAMA AGROECONÓMICO DE LA GUANÁBANA (*Annona muricata*) EN AMÉRICA

Emma Gloria Ramos Ramírez

Carlos García Pérez

María del Pilar Méndez Castrejón

Juan Alfredo Salazar Montoya

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3011230554

CAPÍTULO 5..... 38

DESCRIPCIÓN FÍSICA DE SEMILLAS DE GENOTIPOS DE MAÍZ AZUL

Germán Fernando Gutiérrez-Hernández

José Luis Arellano-Vázquez

Luis Fernando Ceja-Torres

Estela Flores-Gómez

Patricia Vázquez-Lozano

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3011230555

CAPÍTULO 6..... 44

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MALEZAS TOLERANTES AL GLIFOSATO

David Antonio Moreno Medina

Carmen Yazmin Rojas Cardona

Alma Cuellar Sánchez

Victor Becerra Ruiz

Esteban Montiel Palacios

José Luis Gadea Pacheco

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3011230556

CAPÍTULO 7..... 53

ENFERMEDADES DE IMPORTANCIA ECONÓMICA EN EL CULTIVO DE LA CAÑA DE AZÚCAR (*SACCHARUM* SPP.) EN MÉXICO

Manuel de Jesús Bermúdez Guzmán

Francisco Javier Delgado Virgen

Jeovani Francisco Cervantes Preciado

Mario Orozco Santos

Claudia Yared Michel López

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3011230557

CAPÍTULO 8..... 88

APERTURAS Y ESTRATEGIAS COMO MÉTODO EN LA ENSEÑANZA AGROPECUARIA

Rafael Menendez

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3011230558

CAPÍTULO 9.....92

COMPOSTAJE-VERMICOMPOSTAJE, APROVECHAMIENTO SECUENCIAL DE RESIDUOS VINÍCOLAS: PRIMEROS RESULTADOS

Manuela Andrés Abellán
Marta Isabel Picazo Córdoba
Consolación Wic Baena
Manuela Rubio García
Rocío Ballesteros González
Francisco Ramón López Serrano
Francisco Antonio García Morote
Eva María Rubio Caballero
Soledad Ramírez Guijarro
José Manuel Flores López-Pintor
Carlos García Izquierdo

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3011230559

CAPÍTULO 10..... 100

BIOPROCESOS PARA EL TRATAMIENTO DE FECAS CANINAS

Ian Homer Bannister
María Teresa Varnero
Fabian Abarza Villalobos

 https://doi.org/10.37572/EdArt_30112305510

CAPÍTULO 11..... 114

AS BEBIDAS DE LEGUMINOSAS COMO ALTERNATIVA AO LEITE: BEBIDAS DE GRÃO-DE-BICO E DE TREMOÇO COM DIGESTIBILIDADE MELHORADA E POTENCIAL BIOACTIVO PARA A SAÚDE HUMANA

Carla Margarida Duarte
Joana Mota Guerreiro
Ricardo Manuel Assunção
Carla Martins
Ana Cristina Ribeiro
Ana Isabel Lima
Anabela Raymundo
Maria Cristiana Nunes
Ricardo Boavida Ferreira

Isabel de Sousa

 https://doi.org/10.37572/EdArt_30112305511

CAPÍTULO 12142

USO DE ACOLCHADOS PLÁSTICOS PARA REDUCIR EL IMPACTO DEL HUANGLONGBING Y PROMOVER PRECOCIDAD DE LA PRODUCCIÓN EN LIMÓN MEXICANO

Mario Orozco Santos

Manuel de Jesús Bermúdez Guzmán

Karina de la Paz García Mariscal

José Concepción García Preciado

 https://doi.org/10.37572/EdArt_30112305512

CAPÍTULO 13162

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF MIXED PIGS FOR SUSTAINABILITY IN THE LEGAL AMAZON, BRAZIL

Leandro Macedo Miranda

Thiago Machado da Silva Acioly

Diego Carvalho Viana

Valene da Silva Amarante

 https://doi.org/10.37572/EdArt_30112305513

CAPÍTULO 14172

MICROORGANISMOS E RESÍDUO AGROINDUSTRIAL VISANDO INCREMENTOS NA FERTILIDADE DE UM SOLO DEGRADADO

Jéssica Alves de Oliveira

Diego Gonçalves Feitosa

Flávia Mendes dos Santos Lourenço

Katia Luciene Maltoni

Ana Maria Rodrigues Cassiolato

 https://doi.org/10.37572/EdArt_30112305514

SOBRE O ORGANIZADOR.....183

ÍNDICE REMISSIVO184

CAPÍTULO 11

AS BEBIDAS DE LEGUMINOSAS COMO ALTERNATIVA AO LEITE: BEBIDAS DE GRÃO-DE-BICO E DE TREMOÇO COM DIGESTIBILIDADE MELHORADA E POTENCIAL BIOACTIVO PARA A SAÚDE HUMANA

Data de submissão: 05/11/2023

Data de aceite: 21/11/2023

Carla Margarida Duarte

LEAF-Linking Landscape
Environment, Agriculture and Food
Instituto Superior de Agronomia
Universidade de Lisboa
Tapada da Ajuda, Lisbon, Portugal
IUEM, Instituto Universitário Egas Moniz
Egas Moniz-Cooperativa de Ensino Superior
CRL, Caparica, Portugal
<http://orcid.org/0000-0003-0699-5611>

Joana Mota Guerreiro

LEAF-Linking Landscape
Environment, Agriculture and Food
Instituto Superior de Agronomia
Universidade de Lisboa
Tapada da Ajuda, Lisbon, Portugal
<http://orcid.org/0000-0002-8835-852X>

Ricardo Manuel Assunção

IUEM, Instituto Universitário Egas Moniz
Egas Moniz-Cooperativa de Ensino Superior,
CRL, Caparica, Portugal
Departamento de Alimentação e Nutrição
Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal
CESAM, Centro de Estudos do
Ambiente e do Mar
Universidade de Aveiro
Aveiro, Portugal
<https://orcid.org/0000-0002-4375-0456>

Carla Martins

Departamento de Alimentação e Nutrição
Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge
Lisboa, Portugal
NOVA Escola Nacional de
Saúde Pública
Centro de Investigação de
Saúde Pública
Universidade NOVA de Lisboa
Lisboa, Portugal
<https://orcid.org/0000-0001-7930-2914>

Ana Cristina Ribeiro

LEAF-Linking Landscape
Environment, Agriculture and Food
Instituto Superior de Agronomia
Universidade de Lisboa
Tapada da Ajuda, Lisbon, Portugal
Faculdade de Farmácia de Lisboa,
Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal
<https://orcid.org/0000-0001-9555-5735>

Ana Isabel Lima

LEAF-Linking Landscape
Environment, Agriculture and Food
Instituto Superior de Agronomia
Universidade de Lisboa
Tapada da Ajuda, Lisbon, Portugal
Faculdade de Medicina Veterinária
Universidade Lusófona
Lisboa, Portugal
<https://orcid.org/0000-0001-8251-6286>

Anabela Raymundo

LEAF-Linking Landscape
Environment, Agriculture and Food
Instituto Superior de Agronomia
Universidade de Lisboa
Tapada da Ajuda, Lisbon, Portugal
<https://orcid.org/0000-0001-5266-1685>

Maria Cristiana Nunes

LEAF-Linking Landscape
Environment, Agriculture and Food
Instituto Superior de Agronomia
Universidade de Lisboa
Tapada da Ajuda, Lisbon, Portugal
<https://orcid.org/0000-0002-1281-8606>

Ricardo Boavida Ferreira

LEAF-Linking Landscape
Environment, Agriculture and Food
Instituto Superior de Agronomia
Universidade de Lisboa
Tapada da Ajuda, Lisbon, Portugal
<http://orcid.org/0000-0002-5027-7564>

Isabel de Sousa¹

LEAF-Linking Landscape
Environment, Agriculture and Food
Instituto Superior de Agronomia
Universidade de Lisboa
Tapada da Ajuda, Lisbon, Portugal
<http://orcid.org/0000-0001-9384-7646>

RESUMO: Existe uma grande procura de substitutos do leite ($\pm 3,5\%$ P) à base de plantas, a grande maioria das vezes com baixo teor em proteína ($< 1,5\%$ P). No entanto é possível aproximarmo-nos do valor proteico do leite se utilizarmos sementes de leguminosas ricas em proteína e as tecnologias de processamento adequadas. O principal objectivo deste trabalho foi avaliar o impacto do processamento nas características das bebidas produzidas com tremço e grão de bico e avaliar o seu potencial impacto na saúde, nomeadamente na digestibilidade e em bioactividades específicas. Os resultados sugerem que as bebidas à base destas leguminosas possuem elevadores teores em proteína (3,2% para o grão-de-bico e 4,1% para o tremço) semelhante aos teores do leite de vaca. Os níveis de anti-nutrientes característicos das leguminosas foram reduzidos consideravelmente com um processamento estratégico. No entanto, quando presentes em pequenas quantidades, alguns destes factores anti-nutricionais oferecem benefícios para a saúde. O controlo das condições de processamento é um ponto fulcral neste equilíbrio sensível, e serve de ferramenta para se tirar vantagem destes benefícios. A

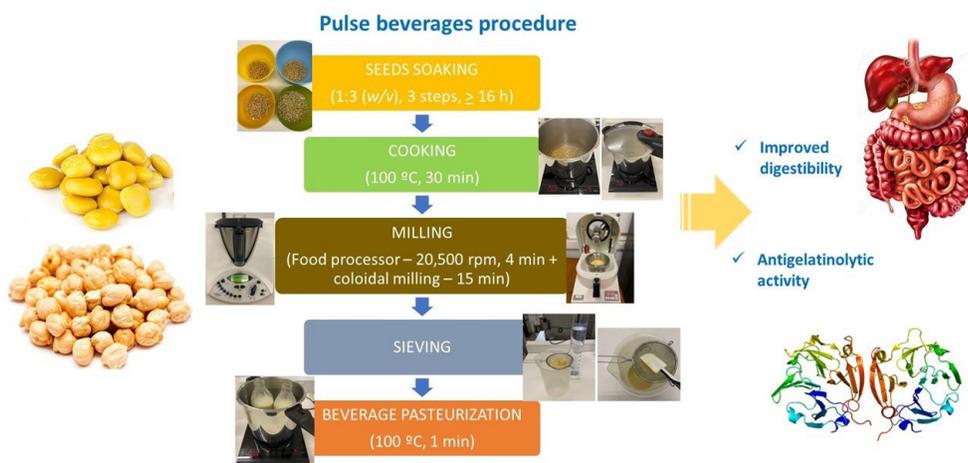
¹ Correspondência: Isabel Sousa isabelsousa@isa.ulisboa.pt

hidrólise da proteína foi evidenciada na digestão *in vitro*, bem como a bioacessibilidade limitada de minerais. Estas bebidas de grão-de-bico e de tremço além de serem altamente digeríveis, também possuem potencial anti-inflamatório e anti-cancerígeno avaliado pela inibição da metaloproteinase MMP-9.

PALAVRAS-CHAVE: Bebidas não lácteas. Leguminosas. Digestibilidade. Bioacessibilidade. Bioatividade.

PULSE DRINKS AS ALTERNATIVES TO MILK: CHICKPEA AND LUPIN BEVERAGES WITH IMPROVED DIGESTIBILITY AND POTENTIAL BIOACTIVITIES FOR HUMAN HEALTH

VISUAL ABSTRACT:



KEYWORDS: Non-dairy beverages. Pulses. Digestibility. Bioaccessibility. Bioactivity.

1 INTRODUÇÃO

As bebidas vegetais representam uma grande tendência de consumo no segmento em rápido crescimento como é o mercado dos produtos vegetais. Actualmente, o mercado global de alternativas aos produtos lácteos apresenta um crescimento de 17,3 milhares de milhão de dólares em 2018 para 29,6 milhares de milhão de dólares em 2023 a uma taxa de crescimento anual de 11,4%, sendo a região Ásia-Pacífico a que representa a maior fatia de mercado (MINTEL, 2018; MARKET AND MARKETS, 2019). Tem havido uma grande procura de substitutos do leite, para além de bebidas à base de soja, devido a razões de saúde diversas (ex. intolerância à lactose, alergia às proteínas do leite, hipercolesterolemia, presença de hormonas, antibióticos ou resíduos de pesticidas),

problemas de sustentabilidade ou razões éticas tais como preocupações relacionadas com a criação de gado e os enormes impactos ambientais (SCRIMSHAW & MURRAY, 1988; LIFSCHITZ & SZAJEWSKA, 2015; MAKINEN *et al.*, 2016; TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2019), representando 14,5% das emissões de CO₂ induzidas pelo ser humano (GERBER *et al.*, 2013), além de culturas relacionadas com o desmatamento e transporte de longa duração, como a soja. No entanto, as ofertas do mercado actual são pobres em proteína, com excepção das bebidas à base de soja (3 a 4% P), as bebidas à base de cereais e nozes, tais como arroz, aveia ou amêndoa que contêm teores entre 0,1% e 1,5% (p/v) (LOPES *et al.*, 2020) quando comparadas com 3,3 a 3,5% de proteína no leite de vaca. Portanto, a proposta de desenvolvimento de bebidas ricas em proteínas a partir de leguminosas, como o grão-de-bico e o tremço, pode ser uma alternativa eficaz ao leite de vaca.

As leguminosas são conhecidas pelas suas propriedades nutricionais e promotoras de saúde, e por serem culturas sustentáveis que incorporam azoto no solo, e reduzem significativamente o uso de fertilizantes. As leguminosas são uma boa fonte proteica, de minerais e de fibra, e as suas bebidas terão uma boa composição nutricional, possuindo um baixo índice glicémico (BERNAT *et al.*, 2014; BARMAN *et al.*, 2018). No entanto há uma questão que dificulta o desenvolvimento e a produção generalizada de alimentos a partir de leguminosas: o sabor a “feijão cru”, tão negativamente famoso e notório nas bebidas de soja. Esta característica (“sabor a cru”) pode estar associada à actividade de lipoxigenases e é fortalecida na presença de polifenóis (sabor amargo). Este facto é tipicamente relacionado com bebida de soja, pois a soja é muito rica em gordura (20% da matéria seca), enquanto no grão-de-bico e o tremço os teores são mais baixos (1-5%). A técnica utilizada para remover os *off-flavors* das bebidas à base de leguminosas é a inactivação térmica, mas as temperaturas elevadas conduzem à desnaturação, agregação e redução na solubilidade proteica e perdas de nutrientes (ex. vitaminas e minerais), o que levou à sua utilização restrita como tecnologia fácil de implementar. Além disso, alguns compostos bioactivos das sementes de leguminosas, tais como os inibidores da protease (IPs), proteínas de reserva da semente (γ -conglutina), lectinas, fitatos, oligossacáridos, saponinas e compostos fenólicos podem ter efeitos metabólicos importantes na saúde do consumidor (CHAMP, 2002; CAMPOS-VEJA *et al.*, 2010; MUÑOZ *et al.*, 2018; GRÁCIO *et al.*, 2021; GUZMÁN *et al.*, 2021). Algumas destas substâncias são benéficas, mas outras são consideradas factores anti-nutricionais, que em geral prejudicam a digestão, como os IPs, que diminuem a digestibilidade e absorção das proteínas (HATHCOCK, 1991). Os fitatos ligam-se aos microelementos e minerais reduzindo a sua disponibilidade e não

se degradam durante a cozedura (HATHCOCK, 1991). Por isso, a sua redução efetiva global só pode ser alcançada por degradação enzimática, queilação ou pela germinação e fermentação (MAKINEN *et al.*, 2016; LÓPEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2017), ou ainda por imersão intensiva, pois são bastante solúveis em água.

Alguns factores antinutricionais e os seus produtos de degradação podem ter efeitos benéficos para a saúde, sobretudo se estiverem presentes em pequenas quantidades. A manipulação das condições de processamento, além da remoção de certos compostos indesejados nos alimentos, pode ser necessária para eliminar os efeitos indesejáveis dos factores antinutricionais e aproveitar os seus benefícios para a saúde (GEMEDE & RATTA, 2014). Vários estudos têm mostrado o impacto positivo destas substâncias, nomeadamente na prevenção dos diabetes (MUÑOZ *et al.*, 2018), e também na prevenção do cancro e na sua terapia (GHAZARIAN *et al.*, 2011). No último exemplo, os trabalhos com modelos animais evidenciaram que os inibidores de Bowman-Birk da protease (BBI's) de várias fontes de leguminosas, incluindo a soja, a ervilha, a lentilha e o grão-de-bico, podem prevenir ou suprimir os processos inflamatórios e carcinogénicos do trato gastrointestinal (CLEMENTE & ARQUES, 2014; SRIKANTH & CHEN, 2016). Outros estudos, *in vitro* e *in vivo*, evidenciaram que as propriedades anti-oxidantes do ácido fítico têm um papel benéfico na prevenção do cancro e um efeito positivo na inibição do crescimento de vários tipos de cancro (KUMAR *et al.*, 2021). Trabalhos recentes evidenciaram que extractos proteicos de algumas sementes de leguminosas, nomeadamente as albuminas do *Lupinus albus*, conseguem inibir a metaloproteínase MMP-9 envolvida nos processos de inflamação e cancro, bem como na migração das células cancerígenas do cólon (LIMA *et al.*, 2016; MOTA *et al.*, 2021). Além disso, os IPs resistentes ao calor existentes na soja, mostraram-se mais eficazes e selectivos contra a MMP-9 do que os compostos não proteicos (ex. isoflavonas, saponinas) (LIMA *et al.*, 2017). Devido ao seu papel significativo nas doenças inflamatórias e oncológicas, a MMP-9 é um biomarcador de doença e alvo clínico relevante, e os seus inibidores são actualmente considerados importantes alternativas para lidar com várias doenças humanas, tais como as doenças inflamatórias intestinais, cancro, doenças cardiovasculares, osteoporose e até mesmo distúrbios neurológicos (SAFAVI & ROSTAMI, 2012). De facto, vários trabalhos (LIMA *et al.*, 2016; GUERREIRO, 2016; BASSO, 2020) evidenciaram que algumas sementes de leguminosas pouco estudadas, tais como o tremço e o grão-de-bico, possuem bioactividades mais altas do que outras, tal como a soja, e são muito eficazes na redução das metástases oncológicas e da colite ulcerosa em estudos *in vivo*.

Neste contexto, este trabalho teve como objectivo avaliar o impacto do processamento na manutenção das características nutricionais das bebidas à base de

grão-de-bico e de tremoço, procurando atingir a sua melhor digestibilidade, bem como a sua bioacessibilidade proteica e mineral. Pretendeu-se avaliar as bioatividades nas duas leguminosas selecionadas, quer depois do processamento quer da digestão. Em resumo, este estudo evidenciou que as duas bebidas à base de leguminosas são alternativas eficazes à proteína do leite de vaca e também a outras alternativas vegetais menos nutritivas e digeríveis, possuindo benefícios adicionais para a saúde humana.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PRODUÇÃO DAS BEBIDAS VEGETAIS

O trabalho experimental consistiu no uso de duas sementes de leguminosas diferentes, o tremoço branco doce (*Lupinus albus* L.) e o grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) para produzir bebidas contendo 10% (p/v) de semente seca inteira (com casca). Produziram-se dois lotes de cada bebida de leguminosa e este procedimento foi repetido três vezes para verificação da sua repetibilidade. Em resumo, 150 g de sementes secas e demolidas previamente em água (1:3 p/v) durante 16 h, substituindo a água duas vezes na mesma proporção, foram cozidas durante 30 min numa panela de pressão (7,5 L, Mod. Qualix 8, Magefesa) em 1,5 L de água da torneira. Às sementes cozidas escorridas foram adicionados 1,5 L de água da torneira. A etapa da moenda foi efectuada num processador alimentar a 20.500 rpm (Bimby Worwerk, Wuppertal, Germany), durante 4 min, seguido de simulação de moenda coloidal num almofariz automático (Pulverisette 2, Fritsch GmbH, Germany) em escala laboratorial, a 70 rpm, por 45 min, à temperatura ambiente. Ambas as bebidas de tremoço e de grão-de-bico foram filtradas através de um coador e os diâmetros das partículas resultantes foram analisados num trabalho anterior (LOPES *et al.*, 2020). Por fim, as bebidas das leguminosas foram vertidas para garrafas esterilizadas e mantidas em banho-maria no interior da panela de pressão. Quando a temperatura da bebida atingiu um mínimo de 90 °C, as garrafas foram tapadas e mantidas dentro da panela de pressão fechada durante 1 min.

2.2 TESTES DE DIGESTIBILIDADE

As bebidas à base de grão-de-bico e de tremoço foram submetidas ao método de digestão *in vitro* estático (BRODKORB *et al.*, 2019) que compreende três fases de simulação digestiva sequencial: oral, gástrica e intestinal. Este procedimento foi realizado três vezes para verificar a repetibilidade dos valores de bioacessibilidade da proteína e dos minerais. Resumidamente, 2 mL de cada bebida foram diluídos 1:1 (v/v) em fluido salivar simulado com alfa-amilase de *Bacillus* sp. (75 UI/mL), e incubados durante 2 min

a 37 °C, sob agitação contínua num agitador rotativo (Reax 2, model 444-1113, Heidolph Instruments, Germany). O volume do fluido gástrico simulado com pepsina porcina (2.000 UI/mL) utilizado para diluir o bolo alimentar respeitou a proporção de 1:1 (v/v) e o pH foi ajustado a 3 com HCl na concentração de 10M. A mistura foi incubada 2h, a 37 °C sob agitação constante. O quimo gástrico foi posteriormente diluído 1:1 (v/v) com o fluido intestinal simulado e os sais biliares (10 mM), sendo a pancreatina (100 UI/mL da actividade de tripsina) adicionada com ajuste do pH a 7 (com NaOH a 1M). A incubação posterior a 37 °C, sob agitação constante foi interrompida após 2 horas com Pefabloc, um inibidor da protéase serina (5 mM). Incluiu-se nestes ensaios, um tubo para o branco enzimático, onde os 2 mL da bebida de leguminosa foram substituídos por água desmineralizada. Por forma a obter as fracções solúvel (potencialmente biodisponível) e insolúvel obtidas pela digestão *in vitro*, a *digesta* inteira foi centrifugada a 6,000 x g durante 10 min, a 4 °C.

2.3 CÁLCULO DA BIOACESSIBILIDADE

O termo bioacessibilidade refere-se à fração de proteínas e de elementos minerais que foram libertados das bebidas de leguminosas durante a digestão *in vitro* e presumivelmente se tornaram acessíveis (disponíveis) para absorção através das paredes do intestino delgado. A bioacessibilidade deve ser distinguida do termo biodisponibilidade, o qual é definido como a fracção de nutrientes ou componentes de um alimento que tenham sido eficientemente digeridos *in vivo*, assimilados e posteriormente absorvidos pelo organismo (FERNÁNDEZ-GARCÍA *et al.*, 2009). Daí que se possa dizer que a bioacessibilidade de um dado nutriente seja um pré-requisito para a sua biodisponibilidade. A bioacessibilidade das proteínas e dos minerais (ZHANG *et al.*, 2018) foi calculada em triplicado, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Bioacessibilidade} = \frac{D}{B} \times 100$$

onde D é a concentração do nutriente solúvel na *digesta*, corrigido pelo nutriente correspondente no ensaio do branco enzimático, e B é a concentração inicial do mesmo nutriente na bebida, antes da digestão.

2.4 ANÁLISE DA HIDRÓLISE PROTEICA POR ELECTROFORESE EM GEL

Os perfis proteicos antes e após a digestão *in vitro*, foram analisados em duplicado por SDS PAGE (sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis) em géis de poliacrilamina a 17,5% (p/v) (LAEMMLI, 1970) e corados com nitrato de prata (BLUM *et al.*, 1987).

Utilizaram-se volumes correspondendo a 15 µg de proteína para as bebidas de grão-de-bico e de tremoço, e de 7 µg para as *digesta* respectivas. O branco enzimático com um teor proteico de 7 µg também foi testado para se comparar as amostras com os perfis proteicos das enzimas adicionadas à *digesta* completa. Todas as amostras foram diluídas previamente em 1:5, num tampão Tris HCl a 100 mM, contendo NaCl a 0,3 M para promover a solubilização proteica.

2.5 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

A determinação da proteína total foi realizada num equipamento Dumas Nitrogen Analyser NDA 702 (Velp Scientifica) e o facto de correção utilizado para a conversão de azoto em proteína foi de 5,4 (MARIOTTI *et al.*, 2018). Todas as análises foram realizadas em triplicado e expressas em gramas de proteína por 100 mL de amostra (ou % p/v).

A análise de amido total foi determinada de acordo com o kit Megazyme Total Starch Assay Procedure (K-TSTA) que se baseia no método oficial AOAC 996.11 (2005), tendo em conta procedimentos específicos para amostras nas quais o amido está presente sob a forma solúvel ou em suspensão. As análises foram realizadas em duplicado e expressas em gramas de amido por 100 mL de amostra.

O teor em D-glucose foi obtido por cromatografia HPLC (high-performance liquid chromatography) (SANTOS *et al.*, 2019). Em resumo, 2 mL de cada amostra foi centrifugada a 7.200 x g durante 10 min, e recolheram-se 500 µL do sobrenadante. Após a sua diluição em H₂SO₄ (50 mM) (1:1 v/v), as amostras foram centrifugadas (7.200 x g, 10 min) para rejeitar o precipitado proteico, e filtradas sob vácuo através de um filtro com um diâmetro de poro de 0,20 µm. A glucose foi quantificada num sistema HPLC (Waters) equipado com um detector de índice de refração (Waters 2414) e uma coluna RezexTM ROA de Ácido Orgânico H⁺ (8%) de 300 mm × 7,8 mm (phenomenex), a 65 °C. O ácido sulfúrico (5 mM) foi utilizado como fase móvel a 0,5 mL.min⁻¹. A análise foi realizada em triplicado e os resultados expressos em gramas de glucose por 100 mL de amostra.

O teor de hidratos de carbono total foi realizado em triplicado e de acordo com o método Dubois (DUBOIS *et al.*, 1951). Os resultados são expressos em gramas de hidratos de carbono total por 100 mL de amostra.

O teor em cinzas foi determinado por gravimetria através da incineração de triplicados a 550 °C numa mufla (Snol LHM01, Utena, Lithuania) de acordo com o método AOAC 923.03 (2005). Os resultados são expressos em gramas de cinzas por 100 mL de amostra.

A matéria seca também foi determinada por gravimetria através da secagem a 105 °C numa estufa (Binder, Germany) até a amostra atingir um peso constante, de acordo

com o método AOAC 934.01 (2000), e em triplicados. O resíduo sólido nas bebidas foi calculado em percentagem.

O valor energético de cada bebida à base de leguminosas foi calculado considerando os factores de conversão (Regulation (EC) No 1169/2011) para proteína (4 kcal/g; 17kJ/g), gordura (9 kcal/g; 37kJ/g) e hidratos de carbono (4 kcal/g; 17kJ/g). O cálculo do teor em gordura para cada bebida teve em conta que 10 g de semente de leguminosa seca (em 100 mL) contém 0,50 g de gordura no grão-de-bico e 0,24 g de gordura no tremçoço (PortFIR, 2019).

O conteúdo em minerais foi avaliado por espectrometria de emissão atómica (ICP-OES: iCAP 7000 Series Spectrometer equipado com um ASX-520 AutoSampler, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) baseado no método AOAC 984.27 (2000). Resumidamente, 5 mL de cada amostra foi transferida para recipientes de digestão, onde se adicionaram 9 mL de HCl (37%) e 3 mL de HNO₃ (65%). A digestão (SCP Science, DigiPREP MS, Baie d'Urfe, QC, Canada) ocorreu a 15 min/ 45 °C, 15 min/ 80 °C, e 60 min/ 105 °C. Após o arrefecimento, adicionaram-se 50 mL de água destilada, e deixou-se a solução em repouso. Por fim, o sobrenadante límpido foi utilizado para a análise no ICP. Foram identificados onze elementos (Na, K, Ca, Mg, P, S, Fe, Cu, Zn, Mn, B) nos triplicados. Os resultados são expressos em mg de mineral por 100 mL de amostra.

2.6 ANÁLISE DE ANTI-NUTRIENTES

O teor em ácido fítico nas bebidas foi determinado em triplicados utilizando o método de Gao e colaboradores (2007). Resumidamente, as amostras liofilizadas foram mantidas sob agitação a 220 rpm durante 16 h em solução de HCl a 2.4% (v/v) (1:20 p/v). As amostras foram posteriormente centrifugadas a 1,000 x g, durante 20 min a 10 °C, numa centrífuga Beckman Coulter™ Allegra™ 25R até se obterem sobrenadantes límpidos. Os sobrenadantes foram recolhidos para o desenvolvimento de cor. Obteve-se previamente uma curva de calibração a partir de uma solução de ácido fítico com uma concentração de 25 mg/mL (SC-250718, Santa Cruz Biotechnology) variando entre 0 a 3,5 mg/mL. Às amostras foi adicionado um volume do reagente de Wade modificado (0,03% (w/v) FeCl₃·6H₂O + 0,3% ácido sulfosalicílico (p/v)) na proporção de 3:1 (v/v), seguindo-se a sua mistura completa num vortex e centrifugação a 1.000 x g por 10 min a 10 °C, numa centrífuga Himac CT15RE. A leitura da absorvância foi medida a 500 nm no espectrofotómetro Synergy HT, da Bio-TEK. Os resultados finais são expressos em gramas de ácido fítico por 100 mL de bebida e em mg/g de ácido fítico por peso de bebida.

A actividade das lectinas (actividade hemaglutinante) das amostras de extractos proteicos foi realizada de acordo com o método descrito por Ribeiro e colaboradores (2012). Resumidamente, ambas as bebidas de grão-de-bico e de tremçoço, bem como as suas *digesta*, foram primeiro desalinizadas através de colunas PD-10 previamente equilibradas em solução salina (0.9% p/v NaCl), seguida de ultra filtração a 1.400 x g e 4 °C (Macrosep MWCO: 10kD, Pall Corporation), por forma a lavar todas as amostras com a solução salina e a reduzi-las a volumes contendo 50 e 100 µg of protein. A última centrifugação foi efectuada com uma solução salina contendo CaCl₂ a 2 mM e MgCl₂ a 2 mM. Para a determinação da actividade hemaglutinante, foram utilizados 5 mL de eritrócitos de Coelho e as amostras foram lavadas três vezes em solução salina por centrifugação (1.800 x g, 12 °C, 6 min), tendo sido posteriormente incubadas com tripsina (Sigma, T0303), numa concentração final de 0,1% (w/v) de solução salina, e agitadas a 120 rpm por 1 h a 37 °C. A suspensão de 4% (v/v) de eritrócitos tripsinizados, foi armazenada a 4 °C e utilizada posteriormente nos ensaios da actividade hemaglutinante. As determinações da actividade hemaglutinante exigiram a análise de proteínas (50-100 µg em solução salina de 50-70 µL) diluídas em série (1:2) numa microplaca de 96 pocilhos. A suspensão de eritrócitos (50-70 µL) foi adicionada e a microplaca incubada por 30 min a 37 °C antes da avaliação visual. Os controlos positivo (lectina Con-A (concanavalina A) a 0,5 mg/mL) e negativo (salina) foram preparados. Uma U.H. (Unidade de Hemaglutinação) é definida como a concentração mínima de proteína que induz a aglutinação eritrocitária (n refere-se à diluição).

$$U. H. = \frac{\text{Concentração da Proteína Total}}{2^{n-1}}$$

2.7 ENSAIOS *IN VITRO* COM CÉLULAS HT-29

2.7.1 Culturas celulares HT29

Foi utilizada a linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano, HT29 (ECACC 85061109), obtida de uma mulher branca de 44 anos. As células HT29 foram mantidas de acordo com o trabalho de Lima e colaboradores (2016).

2.7.2 Ensaio de cicatrização de feridas

Para a análise da migração celular, realizou-se o ensaio de cicatrização de feridas (*wound healing assay*) de acordo com Lima e colaboradores (2016). As células HT29 foram crescidas em placas com 24 poços (5x10⁵ células/poço) durante 24h ou

até 80% de confluência. Cada poço foi, subsequentemente, suplementado com meio RPMI fresco contendo as soluções aquosas dos extratos proteicos de ambas as bebidas, numa concentração de 100 µg.mL⁻¹. A área invadida após as 48h foi calculada para cada tratamento e comparada com a área inicial do corte às 0 horas.

2.7.3 Ensaios de viabilidade e proliferação celular

A cultura celular HT29 foi semeada em placas de 96 poços (2x10⁴ cells/well), os extratos proteicos solúveis de ambas as bebidas foram adicionados numa concentração de 100 µg.mL⁻¹ como descrito acima e as células foram incubadas durante 48h. O meio extracelular foi colhido e as células foram lavadas com PBS (tampão fosfato-salino) para remover a debris celular, e o crescimento e viabilidade celular foram determinados usando o ensaio do MTT (3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tal como descrito anteriormente (LIMA *et al.*, 2016).

2.7.4 Actividade catalítica da MMP-9 em células HT29

As actividades gelatinolíticas da MMP-9 em meio de cultura após a exposição a ambas as bebidas durante 48h foram determinadas usando o ensaio DQ (dye-quenched) gelatina como descrito por Lima *et al.* (2016).

2.8 BIOACTIVIDADE ANTIGELATINOLÍTICA DE AMBAS AS BEBIDAS E DIGESTA RESPETIVA

As bebidas de tremço e grão-de-bico tal como as respetivas frações solúveis das *digesta* foram testadas no ensaio de actividade gelatinolítica (descrito em 2.7.4) para se compreender a sua actividade inibitória contra a MMP-9.

Este ensaio consiste na proteólise de gelatina com fluorescência intrínseca adquirida na *Invitrogen* (Carlsbad, CA, EUA). A gelatina DQ foi dissolvida em água bidestilada, com uma concentração final de 1 mg/mL. Todas as soluções e diluições foram preparadas com o tampão de ensaio (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7,6, containing 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ and 0,01% v/v Tween 20). O ensaio foi realizado numa placa de 96 poços (chimney, 96-well, preta). Em cada poço foi adicionado 0,1 mM de MMP-9 (Sigma), 100 µg/mL da fração total proteica de cada bebida e também das *digesta* (para um volume final de 200 µL) e a placa foi incubada a 37 °C durante 1h. Subsequentemente, a DQ-gelatin (numa concentração final de 2,5 µg/mL) foi adicionada a cada poço e a placa foi incubada novamente durante 1h. Os valores de fluorescência foram medidos (ex. 485 nm/em. 530 nm). Em cada ensaio, um controlo positivo (sem fração proteica) e um negativo

(sem enzima) foram incluídos para todas as amostras, para corrigir possíveis actividades proteolíticas presentes nas amostras proteicas. Todos os dados foram corrigidos através da subtração dos controlos negativos correspondentes. Foram realizados triplicados por amostra.

2.9 DESENHO EXPERIMENTAL

O delineamento inteiramente casualizado (Complete Randomized Design (CRD)) foi utilizado devido à baixa variabilidade na produção e digestão das bebidas (2 factores). As duas bebidas de leguminosas foram submetidas a treze procedimentos analíticos diferentes (13 níveis) tendo resultado em nove resultados físico-químicos, valor de bioacessibilidade, actividade inibitória da MMP-9 e avaliação da migração e proliferação das células cancerígenas. As duas *digesta* respectivas também foram testadas para a actividade da lectina, teor em minerais, estimativa da bioacessibilidade e actividade inibitória sobre a MMP-9 (4 níveis). O número de réplicas foi no mínimo 3.

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento estatístico dos dados foi realizado no software SPSS Statistics (v.20, IBM SPSS Statistics, New York, USA). Procedeu-se à análise de variância (one-way ANOVA) para avaliar as diferenças significativas entre amostras com um nível de significância de 95% ($p < 0,05$). Para comparações múltiplas utilizou-se o teste Tukey HSD.

3 RESULTADOS

3.1 COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL

O perfil nutricional das bebidas de leguminosas é mostrado na Tabela 1. A contribuição energética da proteína, dos hidratos de carbono e da gordura é de 24,2%, 6,4% e 8,4% na bebida de grão-de-bico e de 51,5%, 41,6% e 6,9% na bebida de tremço, respectivamente.

A avaliação da composição nutricional revelou que as bebidas de tremço e de grão-de-bico são importantes fontes de proteína. A bebida de tremço apresentou maior (4,05% p/v) valor significativo ($p < 0,05$) do que a bebida de grão-de-bico (3,24% p/v).

O teor de amido significativamente maior na bebida de grão-de-bico (1,391 g/100 mL), comparativamente com o da bebida de tremço (0,008 g/100 mL), já era espectável pelo conteúdo em amido dessas leguminosas: 10 g de sementes secas (em 100 mL) contêm 4,5 g de amido no grão-de-bico e 0,7 g no tremço (PortFIR, 2019). Os

valores obtidos nas bebidas confirmaram a libertação de amido das sementes durante o processamento/cozimento e são compatíveis com a sua composição e teor de hidratos de carbono (também significativamente maior na bebida de grão-de-bico). Além disso, a bebida de grão-de-bico não continha amido resistente e apresentou hidrólise do amido em glucose, após se ter adicionado α -amilase durante o processamento (dados não mostrados) com o objectivo de se ultrapassar a sua grande viscosidade/consistência causada pela gelatinização do amido (como observado em nosso trabalho anterior (LOPES *et al.*, 2020).

A bebida de tremoço apresentou um teor de glucose significativamente maior ($p < 0,05$) do que a bebida de grão-de-bico (Tabela 1). O *Lupinus albus* não armazena glucose na forma de amido nas sementes como o grão-de-bico, mas é naturalmente rico em oligossacáridos contendo glucose (RAYAS-DUARTE & MOHAMED, 1995; BARNEVELD, 1999).

O baixo teor em cinzas em ambas as bebidas era espectável já que só contêm 10% (p/v) de semente seca.

Tabela 1. Comparação da composição nutricional nas bebidas à base de leguminosas. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão (DP) (n=3). Letras distintas nas amostras por parâmetro, evidenciam diferenças significativas entre elas ($p < 0,05$). *cálculos explicados na secção 2.5.

Bebida	Energia (kcal/100 mL) (kJ/100 mL)	Proteína (g/100 mL)	Total de Hidratos de carbono (g/100 mL)	Amido (g/100 mL)	Glucose (g/100 mL)	Gordura* (g/100 mL)	Cinzas (g/100 mL)	Humidade (%)
Grão-de-bico	53,5 ^a \pm 1,57 (226,7 \pm 6,67)	3,2 ^b \pm 0,16	9,0 ^a \pm 0,34	1,38 ^a \pm 0,220	0,06 ^b \pm 0,000	0,50	0,16 ^b \pm 0,010	93,9 ^a \pm 0,15
Tremoço	31,4 ^b \pm 1,96 (133,3 \pm 8,31)	4,1 ^a \pm 0,25	3,3 ^b \pm 0,65	0,01 ^b \pm 0,060	0,09 ^a \pm 0,000	0,24	0,20 ^a \pm 0,020	93,8 ^a \pm 0,02

3.2 ANÁLISE DE ANTI-NUTRIENTES

Tendo em conta o ácido fítico, este anti-nutriente pode formar complexos com as proteínas, alterando a sua estrutura, tornando-as menos solúveis, e isto afecta a degradação enzimática e a digestão peptídica (CHITRA *et al.*, 1996; KUMAR *et al.*, 2010). Apesar disso, os resultados mostraram que o teor em ácido fítico nas duas bebidas de

leguminosas (Tabela 2) não inibiu as enzimas digestivas durante a digestão estática, nem prejudicou a digestibilidade das suas proteínas. Este facto foi confirmado pela boa bioacessibilidade dos peptídeos produzidos durante a digestão *in vitro* de ambas (Tabela 3).

Tabela 2. Teor em ácido fítico nas bebidas à base de leguminosas. Os valores estão representados como média \pm DP (n=3). Letras distintas nas amostras evidenciam diferenças significativas entre elas ($p < 0.05$).

Bebida	Ácido fítico (g/100 mL)
Grão-de-bico	0,78 ^b \pm 0,010
Tremoço	0,83 ^a \pm 0,000

Tabela 3. Teor em proteína antes e após a digestão *in vitro* das bebidas de grão-de-bico e de tremoço. As percentagens da bioacessibilidade são evidenciadas para cada par bebida-digesta. Os valores estão representados como média \pm DP (n=3). As mesmas letras no teor em proteína por amostrta evidenciam uma diferença não significativa entre os parâmetros ($p \geq 0.05$).

	Teor em proteína na bebida (%)	Proteína solúvel após digestão (%)	Bioacessibilidade (%)
Grão-de-bico	3,2 ^a \pm 0,16	3,3 ^a \pm 0,07	100%
Tremoço	4,1 ^b \pm 0,25	3,9 ^b \pm 0,00	96%

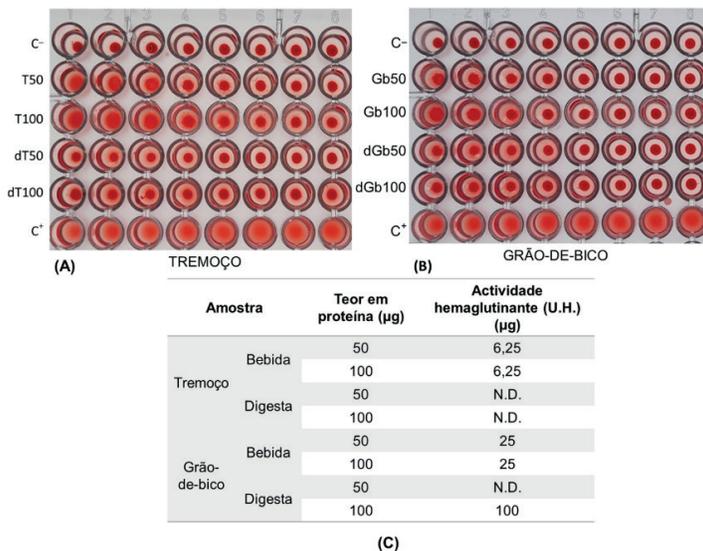
O ácido fítico também pode bloquear a absorção de minerais dos alimentos, interferindo na biodisponibilidade de nutrientes, afectando a absorção intestinal de alguns minerais essenciais importantes e necessários para atender às necessidades de cálcio, magnésio, ferro e zinco (FRONTELA *et al.*, 2011) no corpo humano. Ainda assim, o teor em ácido fítico existente nas bebidas (Tabela 2) não evidenciou interferência na digestão dos minerais já que os catiões bivalentes, tais como o Ca, o Mg e o Fe, mostraram bioacessibilidade após a digestão *in vitro* (Tabela 4). O efeito do tratamento térmico da etapa de cozedura foi mais eficiente para amolecer o tecido vegetal nas sementes de grão-de-bico do que nas do tremoço, permitindo uma maior permeabilidade dos minerais e do ácido fítico para a água de cozedura, sendo assim perdidos no processo. Isto pode explicar a bioacessibilidade relevante dos catiões bivalentes na bebida de tremoço, e a sua concentração ligeiramente superior (0,83 contra 0,78 g/100mL) de ácido fítico, quando comparado com a bebida de grão-de-bico.

Tabela 4. Teor em minerais antes e após a digestão *in vitro* das bebidas de grão-de-bico e de tremoço. As percentagens da bioacessibilidade são evidenciadas para cada par bebida-*digesta*. A contribuição mineral de 100 mL de bebida à base de leguminosas, tendo em conta os valores de ingestão dietética de referência (dietary reference intakes (DRI)) para adultos (Regulation (EC) No 1169/2011; THE NATIONAL ACADEMIES PRESS, 2019) está também apresentado como percentagem. Os valores estão representados como média ± DP (n=3). Letras diferentes por elemento mineral representam uma diferença significativa entre as bebidas (p < 0,05).

Teor em minerais								
	Bebida de grão-de-bico (mg/100 mL)	% DRI	Fracção solúvel após digestão (mg/100 mL)	Bioacessibilidade (%)	Bebida de tremoço (mg/100 mL)	% DRI	Fracção solúvel após digestão (mg/100 mL)	Bioacessibilidade (%)
Na	14,24 ^b ± 1,551	0,95	-	-	17,62 ^a ± 0,972	1,17	-	-
K	35,2 ^b ± 2,532	1,76	-	-	42,10 ^a ± 1,922	2,10	2,41 ± 1,091	5,73
Ca	15,27 ^b ± 0,660	1,91	-	-	23,62 ^a ± 0,800	2,95	0,69 ± 0,190	2,93
Mg	7,94 ^b ± 0,481	2,15	0,33 ± 0,01	4,15	10,64 ^a ± 0,643	2,87	1,32 ± 0,182	12,43
P	19,89 ^b ± 0,723	2,84	-	-	37,32 ^a ± 1,682	5,33	5,35 ± 0,551	14,33
S	13,92 ^b ± 0,721	-	-	-	19,28 ^a ± 0,261	-	1,86 ± 1,071	9,65
Fe	0,36 ^b ± 0,010	2,79	-	-	0,77 ^a ± 0,010	5,94	0,24 ± 0,000	31,43
Cu	0,06 ^a ± 0,000	6,50	-	-	0,05 ^a ± 0,000	6,05	0,005 ± 0,002	8,57
Zn	0,17 ^b ± 0,011	1,82	-	-	0,33 ^a ± 0,000	3,50	-	-
Mn	0,19 ^b ± 0,010	9,03	0,01 ± 0,000	2,94	3,36 ^a ± 0,171	163,68	0,19 ± 0,000	5,64
B	0,03 ^b ± 0,000	0,13	-	-	0,06 ^a ± 0,000	0,32	-	-

No que diz respeito à avaliação da actividade de lectina nas bebidas à base de leguminosas (Figura 1), obtida através do ensaio de hemaglutinação, foi evidenciado uma maior actividade na bebida de tremoço (U.H. 6,25 µg), apesar da concentração proteica, quando comparada com a respectiva *digesta* sem actividade de lectina (Figura 1 (A), (C)) e com a bebida de grão-de-bico (U.H. 25 µg) (Figura 1 (B) (C)). Quanto à bebida de grão-de-bico, a sua *digesta* não revelou nenhuma actividade hemaglutinante para as 50 µg de proteína testada, e um valor U.H. de 100 µg para o teor proteico mais elevado, o que significa uma actividade de lectina muito baixa.

Figura 1. Actividades hemaglutinantes (A) e (B): diluições seriadas (1:2) dos extractos das bebidas e das *digesta* (50 µg ou 100 µg de proteína; T - tremoço, dT – *digesta* de tremoço, Gb – grão-de-bico, dGb – *digesta* de grão-de-bico), controlos negativo (C-; salina) e positivo (C+; 35 µg Con-A). (C) Actividade hemaglutinante U.H. (µg) das amostras testadas. (N.D. não detectado)



3.3 BIOACESSIBILIDADE PROTEICA E DE MINERAIS

As bebidas de grão-de-bico e de tremoço evidenciaram muito boa digestibilidade da proteína, traduzidos em valores de bioaccessibilidade de 102% e de 96%, respectivamente (Tabela 3). Os valores de bioaccessibility acima de 100% podem ter resultado de um erro experimental relacionado com a metodologia de quantificação proteica. Apesar disso, não há diferença significativa entre os teores proteicos das bebidas e das fracções solúveis das *digesta*. Os resultados indicaram que as bebidas à base de leguminosas neste estudo contêm péptidos solúveis completamente digeridos, o que é promissor relativamente à disponibilidade de proteínas para absorção após a digestão das bebidas.

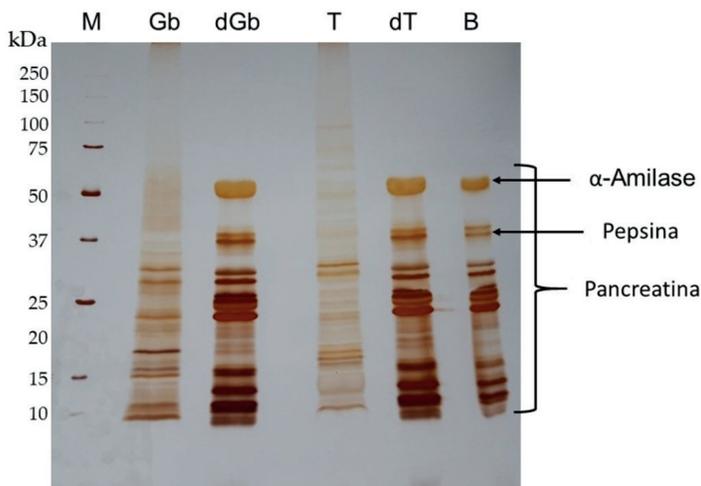
A bebida de tremoço apresentou o teor mais alto em minerais quando comparado com a bebida de grão-de-bico, e foi significativo ($p < 0,05$) para a maioria dos elementos (Tabela 4). Tendo em conta as fracções solúveis (biodisponíveis) obtidas da digestão *in vitro*, a maioria dos elementos minerais da bebida de grão-de-bico não estava bioacessível, excepto para o magnésio e manganês com somente 4,15% e 2,94%, respectivamente. Por outro lado, a bebida de tremoço apresentou valores de bioaccessibilidade para a maioria dos minerais, dos quais, o ferro com 3,43%, o fósforo com 14,33% e o magnésio com 12,43%. Estes valores podem ser explicados pela riqueza intrínseca em minerais do tremoço quando comparados com as sementes de grão-de-bico utilizadas.

3.4 ANÁLISE DA HIDRÓLISE PROTEICA

A digestão proteica pelo método *in vitro* estático (BRODKORB *et al.*, 2019) foi evidenciada por electroforese (Figura 2). As diferenças no perfil polipeptídico entre a bebida e a respectiva *digesta* total são evidentes no gel corado pelo método do nitrato de prata, que possui sensibilidade para revelar os polipeptídeos de baixo peso molecular. A bebida de tremoço (T) apresentou um amplo perfil polipeptídico com pesos moleculares mais representativos que a bebida de grão-de-bico (Gb), enquanto as *digesta* apresentaram polipeptídeos com pesos moleculares inferiores a 50 kDa misturados com as enzimas comerciais adicionadas. Comparando diferenças entre os perfis das *digesta* e do branco enzimático, as *digesta* exibiram alguns péptidos de baixo peso molecular (< 10 kDa) e vários polipéptidos inferiores a 25 kDa, que eram distintos do branco (B). Este facto revelou a grande digestibilidade sofrida pela *digesta* em resultado das enzimas utilizadas.

O perfil electroforético do controlo enzimático (B) tem uma correspondência com as *digesta* das bebidas, evidenciando todas as enzimas utilizadas durante o protocolo, tal como esperado. A α -amilase que se utilizou evidenciou ter um peso molecular entre 58-62 kDa, a pepsina 36 kDa e a pancreatina engloba um grupo de várias enzimas com pesos moleculares desde 13 a 64 kDa (49) (Figura 2).

Figura 2. Hidrólise proteica após a digestão *in vitro*. Gel obtido em condições redutoras de SDS-PAGE e corado com nitrato de prata (17,5% p/v poliacrilamida). Os pesos moleculares expectáveis estão indicados para os padrões de pesos moleculares. A quantidade de proteína carregada em cada linha é de 15 μ g para as bebidas de grão-de-bico ou de tremoço, e de 7 μ g para as duas *digesta* e para o branco enzimático. Abreviaturas: M – marcadores de pesos moleculares proteicos; Gb – polipéptidos da bebida de grão-de-bico; dGb – polipéptidos da *digesta* inteira de grão-de-bico; T – polipéptidos da bebida de tremoço; dT – polipéptidos da *digesta* inteira de tremoço; B – controlo do branco enzimático.



3.5 BIOACTIVIDADES

Para se compreender se as condições de processamento das bebidas de ambas as sementes de leguminosas, mantiveram o seu potencial anti-inflamatório e anticancerígeno, particularmente em relação à sua capacidade inibitória da gelatinase MMP-9 (uma metaloprotease de matriz relacionada com a inflamação e o cancro), foi testada a actividade inibitória das frações proteicas solúveis de ambas as bebidas contra a MMP-9 *in vitro*, bem como o seu potencial contra a proliferação e migração de células de cancro do cólon, usando uma linhagem celular HT29. A Tabela 5 mostra a actividade inibitória dos extratos proteicos de ambas as bebidas (100 µg.mL⁻¹) contra a actividade da MMP-9, migração de células cancerígenas HT29, usando o ensaio de cicatrização de feridas, bem como a proliferação de células cancerígenas HT29, usando o ensaio do MTT.

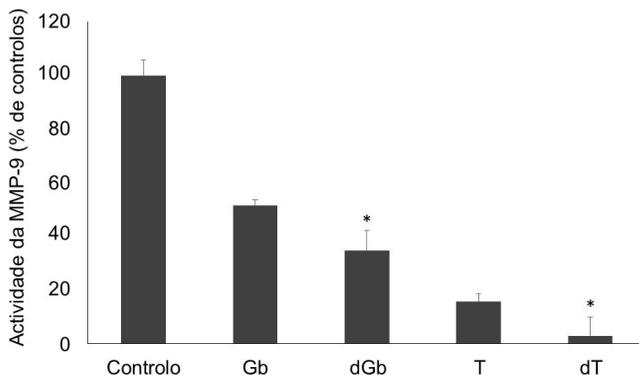
Tabela 5. Efeito dos extratos proteicos das bebidas de grão-de-bico e tremoço contra a actividade da MMP-9, migração e proliferação nas células HT29. As células foram expostas aos extratos proteicos de cada bebida com a concentração de 100 µg.mL⁻¹. A actividade da MMP-9 foi avaliada através do ensaio de DQ-gelatina. A migração celular foi avaliada através do ensaio de cicatrização de feridas e a proliferação celular foi avaliada através do ensaio do MTT. Os valores são apresentados como percentagem de controlos e expressos como médias ± DP (n=3). As letras diferentes representam valores significativos para p < 0,05 vs. controlo.

	Actividade MMP-9 (% de controlos)	Migração celular (% de controlos)	Proliferação celular (% de controlos)
Bebida de grão-de-bico	23,01 ± 0,430 ^a	71,94 ± 17,372 ^a	89,33 ± 10,870
Bebida de tremoço	12,22 ± 1,211 ^a	43,35 ± 16,861 ^b	82,84 ± 4,912

Os resultados mostram que ambas as bebidas de leguminosas foram capazes de reduzir significativamente (p < 0,05) a actividade da MMP-9 e a migração das células cancerígenas HT29, embora não reduza a proliferação celular nas HT29 de maneira significativa. Embora ambas as bebidas apresentem resultados semelhantes na actividade da MMP-9 e na proliferação celular, a redução na migração celular foi significativamente maior (p < 0,05) com a bebida de tremoço quando comparada à bebida de grão-de-bico.

Avaliámos, ainda, se a actividade inibitória de ambas as bebidas contra a MMP-9 também se mantinha após a digestão, comparando o efeito de ambas as bebidas e as respectivas *digesta* na actividade da MMP-9 comercial usando o ensaio de DQ-gelatina. Os resultados obtidos estão presentes na Figura 3.

Figura 3. Efeito dos extratos de bebidas e *digesta* (T - tremçoço,dT – *digesta* tremçoço, Gb – grão-de-bico, dGb – *digesta* grão-de-bico) na actividade gelatinolítica da MMP-9, avaliada pelo método da DQ-gelatina. A actividade da MMP-9 é expressa como fluorescência relativa como % de controlo e corresponde à média de pelo menos 3 réplicas (n = 3) ± DP. * p < 0,05.



No geral, ambas as bebidas apresentaram actividades inibitórias muito significativas contra a MMP-9 comercial ($p < 0,001$), e foram consideravelmente maiores após a digestão *in vitro*, particularmente a bebida de tremçoço, com uma redução de 96% da actividade da MMP-9, em contraste com a bebida de grão-de-bico, para a qual foi obtida inibição de 48% ($p < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

As sementes de leguminosas escolhidas para o desenvolvimento de novas bebidas vegetais, como o grão-de-bico e o tremçoço, apresentaram um teor em proteína semelhante ao do leite de vaca, sendo portanto boas alternativas não lácteas. Apenas a proteína da bebida de soja, com exceção das quantidades reduzidas de cisteína e metionina, é comparável à do leite de vaca, quando se discute as suas composições nutricionais e os benefícios para a saúde de entre as alternativas vegetais comercializadas (VANGA & RAGHAVAN, 2018). Diversas vantagens para a saúde humana são atribuídas às proteínas do grão-de-bico e às proteínas do tremçoço: a lectina γ -conglutina do tremçoço, uma globulina composta por subunidades de 42 kDa, apresentou propriedades benéficas através do seu efeito redutor da glicémia, sendo adequada para diabéticos (GRÁCIO *et al.*, 2021; MAGNI *et al.*, 2004); a proteína deflamina encontrada em sementes de leguminosas, nomeadamente tremçoço e grão-de-bico, demonstrou ser anti-inflamatória em modelos *in vitro* com várias linhas celulares de cancro do cólon, bem como em modelos *in vivo* de doença aguda e crónica, apresentando uma bioactividade inibitória contra a MMP-9 (MOTA *et al.*, 2021; GUERREIRO, 2016). Também a proteína de reserva da semente β -conglutina do *Lupinus albus*, exerceu acção na modulação

glicémica e reduziu o colesterol circulante (GUZMÁN *et al.*, 2021), e um fungicida glico-oligómero natural de 210 kDa, denominado “oligómero que contém Blad” presente em *Lupinus albus* mostrou uma potente actividade antifúngica contra fungos humanos e fitopatogénicos (CARREIRA *et al.*, 2018).

As etapas tecnológicas utilizadas para a produção de bebidas, como a demolha, a cozedura sob pressão e a pasteurização, juntamente com as águas descartadas da demolha e da cozedura, conduziram a valores de ácido fítico de 7,1 e 7,6 mg/g em bebidas de grão-de-bico e tremoço, respectivamente, comparando com os teores mais elevados de ácido fítico entre 9,6 e 12,1 mg/g para o grão-de-bico e para o tremoço cozido noutros estudos (SHI *et al.*, 2018). Esta diferença pode ser devida à combinação de um maior tempo de demolha (16 h) e maior lixiviação durante a etapa de cozedura, o que pode ter levado a uma redução do ácido fítico final e do conteúdo de outros factores anti-nutricionais nas bebidas.

Foram observadas várias diferenças entre os minerais na literatura disponível (CABRERA *et al.*, 2003; ÖZCAN *et al.*, 2013). Essas variações podem ser devido aos diferentes equipamentos utilizados na análise (espectroscopia de absorção atómica versus ICP-OES), concomitantemente com as diferenças de variedade de leguminosas, condições edafoclimáticas, período de colheita e/ou estado nutricional das plantas que podem influenciar o conteúdo mineral das sementes. Por outro lado, os diferentes métodos de digestão *in vitro* não permitem uma comparação precisa entre a biodisponibilidade mineral das sementes de leguminosas e os estudos realizados anteriormente. Apesar disso, os resultados de Zhang e colaboradores (2018) mostraram que a semente de tremoço doce cozida é uma boa fonte de K, Ca, Mg e Mn, e todas as bioacessibilidades minerais do tremoço encontradas eram superiores às obtidas neste trabalho. Estes resultados também podem ser explicados pela possível lixiviação de minerais durante a produção de bebidas, o que pode levar à redução da sua bioacessibilidade (ROUSSEAU *et al.*, 2020). A contribuição mineral de 100 mL das bebidas à base de leguminosas para atingir a ingestão dietética de referência (DRI) estabelecida para adultos (Regulation (EC) No 1169/2011; THE NATIONAL ACADEMIES PRESS, 2019) (Tabela 4) foi maior na bebida de tremoço para a maioria dos elementos minerais, excepto para o cobre na bebida de grão-de-bico, mas todos os valores obtidos foram inferiores ao do leite de vaca (MANUELIAN *et al.*, 2018) e às bebidas vegetais comerciais (SINGHAL *et al.*, 2017). Isto é explicado pelo facto das bebidas à base de plantas geralmente apresentarem grandes variações nas suas propriedades nutricionais e grande discrepância nos nutrientes e na sua biodisponibilidade quando comparadas com o leite (MAKINEN *et al.*, 2016; VANGA

& RAGHAVAN, 2018), o que conduz a potenciais deficiências nutricionais se não forem bem equilibradas através da dieta alimentar (SCHOLZ-AHRENS *et al.*, 2020). Em geral, a composição das bebidas vegetais comerciais contem diversos aditivos, incluindo minerais (especialmente cálcio) e vitamina D, para mimetizar as características nutricionais do leite de vaca (VANGA & RAGHAVAN, 2018). Porém, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma tecnologia para a obtenção de uma bebida à base de leguminosas que incorporasse a maior quantidade de componentes da semente (incluindo a casca), sem aditivos, indo ao encontro do conceito *clean label* e *zero waste*.

Apesar disso, as bebidas à base de leguminosas obtidas neste trabalho não podem ter alegação nutricional para os minerais, exceto no manganês (DRI > 7,5%) (Regulation (EC) No 1169/2011), cujos valores de bioacessibilidade foram de 2,94% e 5,64% para a bebida de grão-de-bico e bebida de tremoço, respectivamente. Esta informação é essencial para que os consumidores conheçam o conteúdo nutricional fiável da bebida (ou alimento), uma vez que deve ser considerada não só a concentração inicial do nutriente a reivindicar, mas também o seu valor de bioacessibilidade após a digestão. Assim, poderia ser legítimo considerar que se a bebida de tremoço (mesmo sem a alegação: “fonte de ferro”) apresenta uma bioacessibilidade do ferro de 31,43%, isto deverá ser considerado aquando da sua rotulagem, já que seria uma boa alternativa para os consumidores vegetarianos pois geralmente apresentam deficiências em ferro (PAWLAK *et al.*, 2016). Esta discussão é cada vez mais relevante quando pensamos no significado de uma alegação nutricional que, na nossa opinião, não pode ser completa a menos que seja considerada a bioacessibilidade do nutriente. Na verdade, o mesmo método *in vitro* e a avaliação da bioacessibilidade mineral do leite de vaca e do leite de soja devem ser usados em estudos futuros para comparar com precisão as diferenças entre estas duas bebidas à base de leguminosas.

O método *in vitro* (BRODKORB *et al.*, 2019) utilizado para mimetizar a digestão humana das bebidas à base de leguminosas, evidenciou sucesso na hidrólise das proteínas. No entanto, alguns polipéptidos com 10 kDa (80 a 90 resíduos de aminoácidos) foram revelados na *digesta* inteira e, se solúveis, estes péptidos provavelmente não serão absorvidos pelo intestino delgado. Aqueles que são transportados activamente nas células epiteliais intestinais são os tripéptidos, dipéptidos e aminoácidos livres. Mas a digestão de proteínas no intestino delgado resulta numa mistura de oligopéptidos dominados por di- a hexapéptidos (FREEMAN *et al.*, 1979). Esses oligopéptidos ainda são hidrolisados pela catálise de peptidases existentes na membrana plasmática apical dos enterócitos do lúmen intestinal (“brush border” peptidases). O modelo de digestão *in vitro* utilizado neste trabalho não inclui estas peptidases (BRODKORB *et al.*, 2019), portanto

não se pode esperar que as bebidas de leguminosas sejam completamente degradadas em aminoácidos livres, di- e tripéptidos (RIEDER *et al.*, 2021).

Os resultados também mostraram que as proteínas em ambas as bebidas foram bem digeridas e que, além disso, as poucas lectinas presentes foram na sua maioria hidrolisadas, sugerindo assim uma boa digestibilidade. Apesar da maioria das lectinas serem resistentes à degradação pelas enzimas digestivas, a sua actividade foi claramente reduzida após a digestão destas bebidas, evidenciando o sucesso da etapa de cozedura na inactivação destas proteínas, o que contribuiu para o aumento nutricional das bebidas (RIBEIRO *et al.*, 2018). Curiosamente, as poucas proteínas de baixo peso molecular que parece não terem sido afetadas pela digestão *in vitro*, apresentaram pesos moleculares semelhantes à proteína bioactiva identificada anteriormente em sementes de grão-de-bico e de tremçoço, que possui bioactividades inibitórias para as gelatinases MMP-9 e MMP-2 (LIMA *et al.*, 2016; MOTA *et al.*, 2021), particularmente no tremçoço, onde se descobriu que um oligómero de baixo peso molecular, com forte actividade inibitória da MMP-9, sobreviveu à proteólise durante a digestão e foi eficaz na redução da colite *in vivo* (MOTA *et al.*, 2021). Se estas bioactividades forem mantidas, poderão acrescentar mais valor às nossas bebidas.

De facto, os nossos resultados relativos às bioactividades das bebidas à base de tremçoço e à base de grão-de-bico (tabela 5), mostraram que ambas apresentam uma forte actividade inibitória contra a MMP-9, enquanto também reduzem a migração de células cancerígenas. Outros estudos mostraram resultados semelhantes (LIMA *et al.*, 2016), onde extractos proteicos de grão-de-bico e de tremçoço reduziram a actividade da MMP-9 e a migração de células cancerígenas, mas não exerceram qualquer toxicidade celular, mantendo-se inalterada a proliferação celular. É importante notar que embora os estudos anteriores tenham evidenciado a presença de inibidores eficazes da MMP-9 nas frações proteicas de baixo peso molecular (LIMA *et al.*, 2016), estas actividades foram encontradas em extractos proteicos de sementes destas leguminosas, quer cruas ou cozidas. O facto de ambas as bebidas de grão-de-bico e as de tremçoço terem mantido a actividade inibitória contra a MMP-9 das suas sementes, mesmo após todos os procedimentos tecnológicos, e ter sido ainda mais pronunciada (possivelmente devido a um efeito de concentração) após a digestão *in vitro* (Figura 3), sugere um elevado potencial no combate a doenças digestivas relacionadas às actividades da MMP-9, como as doenças inflamatórias intestinais (DII) e o cancro colorretal. A resistência às enzimas digestivas pode estar relacionada com o facto destas proteínas serem por si só, inibidoras de proteases, mas apesar disso, este facto deve ser tido em consideração porque a maioria dos compostos bioactivos (particularmente no que diz respeito a doenças inflamatórias

do trato gastrointestinal) são ineficientes visto serem degradadas durante a digestão e perderem a sua actividade. Portanto, o facto desses polipéptidos bioativos resistirem à digestão e ainda realizarem as suas bioactividades após todo o processo digestivo, revela um grande potencial. Esta informação é consistente com trabalhos anteriores que evidenciaram a eficácia do inibidor isolado de *Lupinus* contra a metaloproteinase MMP-9, na redução da inflamação e das lesões provocadas em modelos animais de colite induzida (MOTA *et al.*, 2021; GUERREIRO, 2016) e de desenvolvimento de cancro (BASSO, 2020). Assim, e de um modo geral, como os nossos resultados parecem sugerir que as bebidas à base de leguminosas mantêm estas proteínas bioactivas, além do seu valor nutricional e digestibilidade, também apresentam elevado potencial como alimentos funcionais a incorporar em dietas preventivas contra a colite e as DII.

5 CONCLUSÃO

O simples processo tecnológico que foi utilizado neste trabalho, permitiu a formulação de bebidas à base de leguminosas palatáveis e ricas nutricionalmente que podem oferecer uma alternativa sustentável (resíduo tipo “okara” inferior a 2%) à intolerância às proteínas lácteas. As possíveis alegações nutricionais que poderiam ser utilizadas para ambas as bebidas de leguminosas são: “sem adição de açúcar”, “sem gordura”, “muito baixo teor em sódio” e “fonte de manganês”, mas para a bebida de tremço, é possível ainda ter uma alegação mais específica, a de “fonte de proteína” (Regulation (EC) No 1169/2011) tendo em conta o seu teor proteico. Os resultados também indicaram que as duas bebidas de leguminosas são completamente digeridas, nomeadamente em péptidos solúveis que estarão disponíveis para absorção posterior. Trabalhos futuros poderão considerar o estudo da biodisponibilidade das frações proteicas com baixo peso molecular.

Além disso, os compostos anti-nutricionais estudados (ácido fítico e lectinas), naturalmente presentes nas sementes das leguminosas, são extensivamente reduzidos pelo processamento das bebidas e não prejudicaram a biodisponibilidade dos minerais, nem potenciam eventos de má absorção intestinal.

No entanto, o teor em minerais nestas bebidas à base de leguminosas, nomeadamente em cálcio, magnésio e fósforo, é muito inferior ao do leite, tal como foi mencionado anteriormente, e para se obter uma alternativa vegetal sustentável ao leite utilizando uma abordagem de *clean label*, poderíamos adicionar algas para aumentar o seu conteúdo mineral, como aliás é utilizado comercialmente para algumas bebidas de aveia. Vários estudos foram realizados e confirmam esta abordagem: o trabalho de

Fradinho e colaboradores (2019) mostrou um aumento substancial em Ca, K, Mg e I de massas sem glúten enriquecidas com as algas marinhas *Laminaria ochroleuca*, e outro estudo (KHEMIRI *et al.*, 2020) aumentou em mais de 100%, o teor de cálcio e de ferro em pão sem glúten, com adição de microalgas. Neste último caso, independentemente da espécie utilizada, 1% p/p de adição de microalgas foi suficiente para aumentar em mais de 15%, o valor diário recomendado para o ferro (Regulation (EC) No 1924/2006).

Estas bebidas de tremço e de grão-de-bico, além de serem muito nutritivas e digeríveis, também apresentaram bioactividades específicas de inibição da MMP-9, bem como capacidade de reduzir a migração de células cancerígenas do cólon. Além disso, esta actividade inibitória para a metaloproteinase MMP-9, evidenciou resistência ao processo de digestão, sendo significativamente elevada após esta, tornando estas bebidas alimentos funcionais, podendo ser incluídas em dietas preventivas eficazes contra doenças inflamatórias e cancerígenas, especialmente relacionadas com o sistema digestivo.

6 AUTORIZAÇÕES/ RECONHECIMENTO

Ao submeter o trabalho, os autores assumem responsabilidade por todo o conteúdo da obra.

REFERÊNCIAS

AOAC (2000) **Loss on drying (moisture)**. Method 934.01. In: Official Methods of Analysis, 17th Edition, AOAC International Publisher, Gaithersburg, Maryland, USA.

AOAC (2000) **Determination of Nine Nutritional Elements in Food Products**. Method 984.27. In: Official Methods of Analysis, 17th Edition, AOAC International Publisher, Gaithersburg, Maryland, USA.

AOAC (2005) **Ash of Flour (Direct Method)**, Method 923.03. In: Official Methods of Analysis, 18th Edition, AOAC International Publisher, Gaithersburg, Maryland, USA.

BARMAN, A.; MARAK, C. M.; BARMAN, R.; SANGMA, C. S. **Nutraceutical properties of legume seeds and their impact on human health**. In: Jimenez-Lopez JC, Clemente A, editors. *Legume seed nutraceutical research*. IntechOpen, London, UK. (2018). p. 1-22.

BARNEVELD, R. J. **Understanding the nutritional chemistry of lupin (*Lupinus spp.*) seed to improve livestock production efficiency**. *Nutr Res Rev.* (1999) 12:203-230. doi: 10.1079/095442299108728938

BASSO, B. M. **An MMP-9 inhibitory protein isolated from *Lupinus albus* seeds in colon adenocarcinoma development**. Master Thesis. Lisbon University, Medicine Faculty, Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes, 2020. Available online at: <http://hdl.handle.net/10451/45712> (accessed June 4, 2021).

BERNAT, N.; CHÁFER, M.; CHIRALT, A.; GONZALEZ-MARTÍNEZ, C. **Vegetable milks and their fermented derivative products**. *Int J Food Studies.* (2014) 3:93-124. doi: 10.7455/ijfs/3.1.2014.a9

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. **Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels**. *Electrophoresis.* (1987) 8:93-99. doi: 10.1002/elps.1150080203

BRODKORB, A.; EGGER, L.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; ASSUNÇÃO, R.; BALANCE, S., *et al.* **INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion.** *Nat Protoc.* (2019) 14:991-1014. doi: 10.1038/s41596-018-0119-1

CABRERA, C.; LLORIS, F.; GIMÉNEZ, R.; OLALLA, M.; LÓPEZ, M. C. **Mineral content in legumes and nuts: Contribution to the Spanish dietary intake.** *Sci Total Environ.* (2003) 308:1-14. doi: 10.1016/S0048-9697(02)00611-3

CAMPOS-VEJA, R.; LOARCA-PIÑA, G.; OOMAH, B. D. **Minor components of pulses and their potential impact on human health.** *Food Res Int.* (2010) 43:461-482. doi: 10.1016/j.foodres.2009.09.004

CARREIRA, A.; FERREIRA, J. B.; PEREIRA, I.; FERREIRA, J.; FILIPE, P.; FERREIRA, R. B.; MONTEIRO, S. **Blad-containing oligomer: a novel fungicide used in crop protection as an alternative treatment for *tinea pedis* and *tinea versicolor*.** *J Med Microbiol.* (2018) 67:198-207. doi: 10.1099/jmm.0.000675

CHAMP, M. **Non-nutrient bioactive substances of pulses.** *Brit J Nutr.* (2002) 88:S307-S319. doi: 10.1079/BJN2002721

CHITRA, U.; SINGH, U.; RAO, R. V. **Phytic acid, *in vitro* protein digestibility, dietary fiber, and minerals of pulses as influenced by processing methods.** *Plant Foods Hum Nutr.* (1996) 49:307-316. doi: 10.1007/BF01091980

CLEMENTE, A.; ARQUES, M. C. **Bowman-Birk inhibitors from legumes as colorectal chemopreventive agents.** *World J Gastroenterol.* (2014) 20:10305-10315. doi: 10.3748/wjg.v20.i30.10305

DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. **A colorimetric method for the determination of sugars and related substances.** *Nature.* (1951) 168:167. doi: 10.1038/168167a0

EGGER, L.; MÉNARD, O.; DELGADO-ANDRADE, C.; ALVITO, P.; ASSUNÇÃO, R.; BALANCE, S., *et al.* **The harmonized INFOGEST *in vitro* digestion method: from knowledge to action.** *Food Res Int.* (2016) 88:217-225. doi: 10.1016/j.foodres.2015.12.006

EUROPEAN COMMISSION. **Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on Nutrition and Health Claims Made on Foods.** Available online at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1924&from=PT> (accessed September 25, 2019).

EUROPEAN COMMISSION. **Regulation (EC) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the Provision of Food Information to Consumers.** Available online at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R1169&from=pt> (accessed September 25, 2019).

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÉLVEZ, A. ***In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency.** *Nutr Res.* (2009) 29:751-760. doi: 10.1016/j.nutres.2009.09.016

FRADINHO, P.; RAYMUNDO, A.; SOUSA, I.; DOMÍNGUEZ, H.; TORRES, M. D. **Edible brown seaweed in gluten-free pasta: technological and nutritional evaluation.** *Foods.* (2019) 8:1-18. doi: 10.3390/foods8120622

FREEMAN, H. J.; KIM, Y. S.; SLEISENGER, M. H. **Protein digestion and absorption in man - Normal mechanisms and protein-energy malnutrition.** *Am J Med.* (1979) 67:1030-1036. doi: 10.1016/0002-9343(79)90645-4

FRONTELA, C.; ROS, G.; MARTÍNEZ, C. **Phytic acid content and “in vitro” iron, calcium and zinc bioavailability in bakery products: The effect of processing.** *J Cereal Sci.* (2011) 54:173-179. doi: 10.1016/j.jcs.2011.02.015

GAO, Y.; SHANG, C.; MAROOF, M. A. S.; BIYASHEV, R. M.; GRABAU, E. A.; KWANYUEN, P., et al. **A modified colorimetric method for phytic acid analysis in soybean.** *Crop Sci.* (2007) 47:1797-803. doi: 10.2135/cropsci2007.03.0122

GEMEDE, H. F.; RATTA, N. **Antinutritional factors in plant foods: potential health benefits and adverse effects.** *Int J Nutr Food Sci.* (2014) 3:284-289. doi: 10.11648/j.ijnfs.20140304.18

GERBER, P. J.; STEINFELD, H.; HENDERSON, B.; MOTTET, A.; OPIO, C.; DIJKMAN, J.; FALCUCCI, A.; TEMPIO, G. (2013). **Tackling climate change through livestock - A global assessment of emissions and mitigation opportunities.** Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome. Available online at: <http://www.fao.org/3/a-i3437e.pdf> (accessed April 9, 2019).

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. **A glycobiology review: carbohydrates, lectins, and implications in cancer therapeutics.** *Acta Histochem.* (2011) 113:236-247. doi: 10.1016/j.acthis.2010.02.004

GRÁCIO, M.; ROCHA, J.; PINTO, R.; FERREIRA, R.; SOLAS, J.; FIGUEIRA, M. E.; SEPODES, B.; RIBEIRO, A. C. **A proposed lectin-mediated mechanism to explain the *in vivo* antihyperglycemic activity of gamma-conglutin from *Lupinus albus* seeds.** *Food Sci Nutr.* (2021) 9:5980-5996. doi: 10.1002/fsn3.252010.1002/fsn3.2520

GUERREIRO, J. P. **Deflamin bioactivities: A novel inhibitory protein of MMP-9 from *Lupinus albus*.** Master Thesis. NOVA Medical School - Faculdade Ciências Médicas (NMS-FCM), 2016. Available online at: <https://run.unl.pt/handle/10362/19541?mode=full> (accessed March 19, 2021).

GUZMÁN, T. J.; MARTÍNEZ-AYALA, A. L.; GARCÍA-LÓPEZ, P. M.; SOTO-LUNA, I. C.; GURROLA-DÍAZ, C. M. **Effect of the acute and chronic administration of *Lupinus albus* γ -conglutin on glycaemia, circulating cholesterol, and genes potentially involved.** *Biomed Pharmacother.* (2021) 133:1-12. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110969

HATHCOCK, J. N. **Residue trypsin inhibitor: data needs for risk assessment.** In: Friedman M, editors. *Nutritional and Toxicological Consequences of Food Processing. Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer: Boston, MA. (1991). Volume 289, p. 273-279.

KHEMIRI, S.; KHELIFI, N.; NUNES, M. C.; FERREIRA, A.; GOUVEIA, L.; SMAALI, I.; RAYMUNDO, A. **Microalgae biomass as an additional ingredient of gluten-free bread: Dough rheology, texture quality and nutritional properties.** *Algal Res.* (2020) 50:101998. doi: 10.1016/j.algal.2020.101998

KUMAR, A.; SINGH, B.; RAIGOND, P.; SAHU, C.; MISHRA, U. N.; SHARMA, S.; LAL, M. K. **Review. Phytic acid: blessing in disguise, a prime compound required for both plant and human nutrition.** *Food Res Int.* (2021) 142:110193. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110193

KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. **Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review.** *Food Chem.* (2010) 120:945-959. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.11.052

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature.* (1970) 227:680-685. doi: 10.1038/227680a0

LIFSCHITZ, C.; SZAJEWSKA, H. **Cow's milk allergy: evidence-based diagnosis and management for the practitioner.** *Eur J Pediatr.* (2015) 174:141-150. doi: 10.1007/s00431-014-2422-3

LIMA, A. I. G.; MOTA, J.; MONTEIRO, S. A. V. S.; FERREIRA, R. M. S. B. **Legume seeds and colorectal cancer revisited: Protease inhibitors reduce MMP-9 activity and colon cancer cell migration.** *Food Chem.* (2016) 197:30-38. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.10.063

LIMA, A.; OLIVEIRA, J.; SAÚDE, F.; MOTA, J.; FERREIRA, R. B. **Proteins in soy might have a higher role in cancer prevention than previously expected: soybean protein fractions are more effective MMP-9 inhibitors than non-protein fractions, even in cooked seeds.** *Nutrients.* (2017) 9:201. doi: 10.3390/nu9030201

LOPES, M.; PIERREPONT, C.; DUARTE, C. M.; FILIPE, A.; MEDRONHO, B.; SOUSA, I. **Legume beverages from chickpea and lupin, as new milk alternatives.** *Foods.* (2020) 9:1-16. doi: 10.3390/foods9101458

LÓPEZ-MARTÍNEZ, L. X.; LEYVA-LÓPEZ, N.; GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E. P.; HEREDIA, J. B. **Effect of cooking and germination on bioactive compounds in pulses and their health benefits.** *J Funct Foods.* (2017) 38:624-634. doi: 10.1016/j.jff.2017.03.002

MAGNI, C.; SESSA, F.; ACCARDO, E.; VANONI, M.; MORAZZONI, P.; SCARAFONI, A.; DURANTI, M. **γ -Conglutin, a lupin seed protein, binds insulin *in vitro* and reduces plasma glucose levels of hyperglycemic rats.** *J Nutr Biochem.* (2004) 15:646 - 650. doi: 10.1016/j.jnutbio.2004.06.009

MAKINEN, O. E.; WANHALINNA, V.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. **Foods for special dietary needs: non-dairy plant-based milk substitutes and fermented dairy-type products.** *Crit Rev Food Sci Nutr.* (2016) 56:339-349. doi: 10.1080/10408398.2012.761950

MANUELIAN, C. L.; PENASA, M.; VISENTIN, G.; ZIDI, A.; CASSANDRO, M.; DE MARCHI, M. **Mineral composition of cow milk from multibreed herds.** *Anim Sci J.* (2018) 11:1622-1627. doi: 10.1111/asj.13095

MARIOTTI, F.; TOMÉ, D.; MIRAND, P. P. **Converting Nitrogen into Protein – Beyond 6.25 and Jones' Factors'.** *Crit Rev Food Sci* (2008) 48: 177-184. doi:10.1080/10408390701279749.

MARKET AND MARKETS (2019). Available online at: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/dairy-alternative-plant-milk-beverages-market-677.html> (accessed February 28, 2019).

MINTEL (2018). **Food and Drink. Consumer market research report.** Available online at: <https://www.mintel.com/press-centre/food-and-drink/us-non-dairy-milk-sales-grow-61-over-the-last-five-years> (accessed March 19, 2019).

MOTA, J.; DIREITO, R.; ROCHA, J.; FERNANDES, J.; SEPODES, B.; FIGUEIRA, M. E.; RAYMUNDO, R.; LIMA, A.; FERREIRA, R. B. **Lupinus albus protein components inhibit MMP-2 and MMP-9 gelatinolytic activity *in vitro* and *in vivo*.** *Int J Mol Sci.* (2021) 22:13286. doi: 10.3390/ijms222413286

MUÑOZ, E. B.; LUNA-VITAL, D. A.; FORNASINI, M.; BALDEÓN, M. E.; DE MEJIA, E. G. **Gamma-conglutin peptides from Andean lupin legume (*Lupinus mutabilis* Sweet) enhanced glucose uptake and reduced gluconeogenesis *in vitro*.** *J Funct Food.* (2018) 45:339-347. doi: 10.1016/j.jff.2018.04.021

ÖZCAN, M. M.; DURSUN, N.; JUHAIMI, F. A. L. **Macro- and microelement contents of some legume seeds.** *Environ Monit Assess.* (2013) 185:9295-9298. doi: 10.1007/s10661-013-3252-x

PAWLAK, R.; BERGER, J.; HINES, I. **Iron status of vegetarian adults: a review of literature.** *Am J Lifestyle Med.* (2016) 12:486-498. doi: 10.1177/15598276166682933

PortFIR. (2019). **Composição de alimentos.** Available online at: <http://portfir.insa.pt/foodcomp/search> (accessed February 21, 2019).

RAYAS-DUARTE, P.; MOHAMED, A. A. **Composition of *Lupinus albus***. *Cereal Chem.* (1995) 72:643-647. Available online at: <https://www.cerealsgrains.org/publications/cc/backissues/1995/Documents/CC1995a146.html>

RIBEIRO, A.; CATARINO, S.; FERREIRA, R. B. **Multiple lectin detection by cell membrane affinity binding**. *Carbohydr Res.* (2012) 352:206-210. doi: 10.1016/j.carres.2012.01.024

RIBEIRO, A. C.; FERREIRA, R.; FREITAS, R. **Chapter 1: Plant lectins: Bioactivities and bioapplications**. In: Atta-ur-Rahman, editors. *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier. (2018). Volume 58, p. 1-42.

RIEDER, A.; AFSETH, N. K.; BÖCKER, U.; KNUTSEN, S. H.; KIRKHUS, B.; MÆHRE, H. K.; BALANCE, S.; WUBSHET, S. G. **Improved estimation of *in vitro* protein digestibility of different foods using size exclusion chromatography**. *Food Chem.* (2021) 358:1-9. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129830

ROUSSEAU, S.; KYOMUGASHO, C.; CELUS, M.; HENDRICKX, M. E. G.; GRAUWET, T. **Barriers impairing mineral bioaccessibility and bioavailability in plant-based foods and the perspectives for food processing**. *Crit Rev Food Sci Nutr.* (2020) 60:826-843. doi: 10.1080/10408398.2018.1552243

SAFAVI, F.; ROSTAMI, A. **Role of serine proteases in inflammation Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases**. *Exp Mol Pathol.* (2012) 93:428-433. doi: 10.1016/j.yexmp.2012.09.014

SANTOS, M. V.; FARIA, N. T.; FONSECA, C.; FERREIRA, F. C. **Production of mannosylerythritol lipids from lignocellulose hydrolysates: Tolerance thresholds of *Moesziomyces antarcticus* to inhibitors**. *J Chem Technol Biotechnol.* (2019) 94:1064-1107. doi: 10.1002/jctb.5853

SCHOLZ-AHRENS, K. E.; AHRENS, F.; BARTH, C. A. **Nutritional and health attributes of milk and milk imitations**. *Eur J Nutr.* (2020) 59:19-34. doi: 10.1007/s00394-019-01936-3

SCRIMSHAW, N. S.; MURRAY, E. B. **The acceptability of milk and milk products in populations with a high prevalence of lactose intolerance**. *Am J Clin Nutr.* (1988) 48:1142-1159. doi: 10.1093/ajcn/48.4.1142

SHI, L.; ARNTFIELD, S. D.; NICKERSON, M. **Changes in levels of phytic acid, lectins and oxalates during soaking and cooking of Canadian pulses**. *Food Res Int.* (2018) 107:660-668. doi: 10.1016/j.foodres.2018.02.056

SINGHAL, S.; BAKER, R. D.; BAKER, S. S. **A comparison of the nutritional value of cow's milk and nondairy beverages**. *J Pediatr Gastr Nutr.* (2017) 64:799-805. doi: 10.1097/MPG.0000000000001380

SRIKANTH, S.; CHEN, Z. **Plant protease inhibitors in therapeutics-focus on cancer therapy**. *Front Pharmacol.* (2016) 7: article 470, 1-19. doi: 10.3389/fphar.2016.00470

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH (2019). Available online at: <https://www.transparencymarketresearch.com/plant-based-milk-market.html> (accessed April 9, 2019).

THE NATIONAL ACADEMIES PRESS. (2019) **Dietary Reference Intakes (DRIs): Elements**. Retrieved from Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies. Available online at: www.nap.edu (accessed April 23, 2019).

VANGA, S. K.; RAGHAVAN, V. **How well do plant based alternatives fare nutritionally compared to cow's milk?** *J Food Sci Technol.* (2018) 55:10-20. doi: 10.1007/s13197-017-2915-y

ZHANG, Y. Y.; PANOZZO, J.; HALL, M. S.; AJLOUNI, S. **Bioaccessibility of some essential minerals in three selected australian pulse varieties using an *in vitro* gastrointestinal digestion model**. *J Food Sci.* (2018) 83:2873-2881. doi: 10.1111/1750-3841.14377

SOBRE O ORGANIZADOR

EDUARDO EUGENIO SPERS realizou pós-doutorado na Wageningen University (WUR), Holanda, e especialização no IGIA, França. Possui doutorado em Administração pela Universidade de São Paulo (USP). Foi Professor do Programa de Mestrado e Doutorado em Administração e do Mestrado Profissional em Comportamento do Consumidor da ESPM. Líder do tema Teoria, Epistemologia e Métodos de Pesquisa em Marketing na Associação Nacional de Pós-Graduação e Pesquisa em Administração (ANPAD). Participou de diversos projetos de consultoria e pesquisa coordenados pelo PENZA e Markestrat. É Professor Titular no Departamento de Economia, Administração e Sociologia, docente do Mestrado em Administração e Coordenador do Grupo de Extensão MarkEsalq no campus da USP/Esalq. Proferiu palestras em diversos eventos acadêmicos e profissionais, com diversos artigos publicados em periódicos nacionais e internacionais, livros e capítulos de livros sobre agronegócios, com foco no marketing e no comportamento do produtor rural e do consumidor de alimentos.

ÍNDICE REMISSIVO

A

Acolchados 142, 143, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 157, 158, 159

Adaptability 162, 163, 167

Ajedrez 88

América 8, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 65, 68, 69

Animal production 162

Animal protein 162

Antocianinas 38, 39, 40, 43

Aprehender 88, 89

Aprovechamiento 2, 26, 27, 33, 34, 92, 102, 153

B

Bacterias 7, 53, 54, 55, 59, 63, 66, 73, 79, 81, 83, 102, 174, 178, 181

Bebidas não lácteas 116

Bioaccessibilidade 116, 119, 120, 125, 127, 128, 129, 133, 134

Bioactividade 116, 124, 132

C

Calibre 11, 14, 159

Caña de azúcar 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 64, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87

CIELab system 17, 18, 19, 20, 24

Cinza de biomassa de cana-de-açúcar 172, 173, 181

Citrus aurantifolia 11, 16, 142, 143, 144, 160

Colour 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 160

Compost 93, 94, 96, 98, 99, 106, 111, 113

Conservación del suelo 2

D

Diaforina 143

Digestibilidade 114, 115, 116, 117, 119, 127, 129, 130, 135, 136

Digestión anaeróbica 100, 101, 103, 112

E

Energía 28, 100, 101, 126

Enfermedades 12, 13, 15, 33, 35, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 81, 82, 83, 84, 85, 100, 101, 142, 155, 159

Excretas de perro 101

Exportación 3, 26, 27, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37

F

Frutos 10, 11, 13, 14, 15, 29, 31, 32, 144, 156, 173

G

Glifosato oxidoreductasa 45

Glomus clarum 172, 173, 176, 177, 178, 179, 180

Guanábana 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 37

H

Heartwood 17, 18, 20, 22, 24

Herbicida 44, 45, 158

Hongos 3, 7, 53, 54, 55, 58, 62, 65, 69, 78, 79, 83

Huanglongbing 10, 11, 16, 142, 143, 144, 159, 160

I

Integrar 88, 89, 90

L

Leguminosas 2, 3, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 122, 125, 126, 127, 128, 129, 131, 132, 133, 134, 135, 136

M

Maíz azul 38, 39, 40, 42

Mecanismo de resistencia 44, 45

Micorriza arbuscular 172

Morphometry 162, 168, 170

P

Plantas 3, 4, 7, 8, 11, 14, 35, 44, 45, 55, 58, 59, 60, 61, 62, 71, 72, 73, 76, 79, 81, 82, 83, 95,

115, 133, 146, 150, 157, 159, 172, 173, 174, 175, 178, 179, 180, 181, 182

Polímero natural 2

Polímero sintético 2

Problemas 3, 7, 10, 44, 78, 88, 89, 95, 100, 101, 110, 111, 113, 117, 144, 155

Producción 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 39, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 89, 91, 92, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 107, 108, 110, 111, 112, 113, 142, 143, 144, 145, 146, 151, 152, 153, 155, 156, 157, 159, 160, 170

Q

Quitina 2, 3, 8

R

Raspajo 93, 94, 95, 96, 98

Resíduos 93, 94, 95, 98, 99, 100, 101, 102, 113, 116, 134, 172

S

Sapwood 17, 19, 20, 22, 23, 24

Solubilização de fosfato 172

Soluciones 88, 101

Subproductos agroindustriales 93

T

Tamaño de semilla 39

V

Valor comercial 11, 14, 30

Vermicompost 93, 94, 96, 99

Virus 53, 54, 55, 61, 62, 64, 65, 68, 69, 76, 77, 78, 79, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 157, 160

Z

Zea mays 39, 43, 182