

Caracterização de óleos de diferentes acessos de amendoeira algarvia

Luís Miguel Varela Carreira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia
(2^o ciclo de estudos)

Orientadora: Prof.^a Maria Graça Costa Miguel
Coorientadora: Prof.^a Ofélia Maria Serralha dos Anjos
Coorientador: Doutor Ângelo Filipe Santos Luís

outubro de 2021

Folha em branco

“Nada acontece por acaso.

Não existe a sorte.

Há um significado por detrás
de cada pequeno ato.”

Nada por acaso – 1978 por HEMUS - Livraria Editora Ltda

Richard Bach

Folha em branco

Agradecimentos

Primeiramente quero agradecer à Professora Ofélia Maria Serralha dos Anjos pelo esforço e dedicação que demonstrou ao encontrar esta oportunidade de trabalhar com a orientadora deste projeto Maria da Graça Costa Miguel. Agradeço à Professora Maria da Graça Costa Miguel pela oportunidade de integrar o seu grupo de investigação, pelo seu suporte e orientação neste trabalho.

Não esquecendo, o apoio fornecido em qualquer altura pelo meu coorientador ainda não mencionado o Doutor Ângelo Filipe Santos Luís por todo o seu rigor, acompanhamento e disponibilidade durante este período pandémico.

Também agradecer a todas as instituições envolvidas UBI, UAlg, IPCB, CEAT. Um carinho especial à FCT da UAlg por ter me acolhido e ajudado neste percurso. Agradeço também à Professora Maria Alcinda dos Ramos das Neves pois este projeto não existiria sem a sua presença; pois foi ela quem propôs este trabalho a minha orientadora sem ela nada teria sido realizado. As amigas lá criadas na UAlg com as minhas colegas de investigação Soukaina El-Gouendouz, Oumaima Boutoub e Sara El Kharraf, pois foram vocês que animaram todos os dias que aí passei; não pediria de outra forma foram todas fantásticas.

Não queria deixar de lembrar todos aqueles professores e funcionários que de alguma forma fizeram parte deste projeto diretamente ou indiretamente. A todos vós um grande obrigado.

Um agradecimento especial, claro, à minha família por todo este apoio incondicional e incentivo para me dedicar todos os dias ao projeto e nunca baixar os braços caso não atingisse resultados desejados. Falando em específico da minha mãe, do meu pai, da minha avó e até certo ponto o meu avô que sempre me acompanhou no coração e me guiou este tempo todo. As minhas tias e tios que sempre me motivaram a continuar a seguir as minhas ambições.

Só foi possível com a vossa ajuda e apoio, obrigado a todos vós...

Bem-hajam

Folha em branco

Resumo

A amendoeira (*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb) é uma árvore que pode atingir 6 m de altura, em condições de cultivo, e tem origem nas regiões montanhosas da Ásia Central. Neste momento, a cultura da amendoeira distribui-se por mais de 60 países, particularmente à volta do Mar Mediterrâneo, do sudoeste da Ásia, Ásia Central, sudoeste da Rússia, Ucrânia, Cáucaso, Himalaias, América do Norte, América do Sul, África do Sul e Austrália.

Na caracterização nutricional do miolo de amêndoa das diversas cultivares do Algarve e de outras não portuguesas, mas que crescem nas mesmas condições edafo-climáticas das cultivares portuguesas, foram analisados os teores de humidade, cinzas, proteína, lípidos, hidratos de carbono e teor energético. Alguns parâmetros de qualidade (índice de acidez, índice de peróxidos, K₂₃₂ e K₂₇₀) dos óleos extraídos das amêndoas bem como os grupos de ácidos gordos (ácidos gordos saturados, mono- e polinsaturados) foram também avaliados. A atividade antimicrobiana dos óleos foi avaliada bem como a dos extratos hidroalcoólicos das amêndoas às quais já tinham sido extraídos os óleos. As atividades antioxidante / anti-inflamatória e anti-tirosinase destes extratos foram também avaliadas.

Os teores de proteína variaram entre 17,03±0,2 e 33,1±0,8 g proteína/100 g sendo a cultivar Desmayo a que apresentou a concentração mais elevada. O teor de lípidos variou entre 36,47±0,07% e 59,25±0,07%, sendo a cultivar Lourencinha a que tinha o teor mais elevado. Os hidratos de carbono variaram entre os valores mínimo e máximo de 3,9±1,6 % e 38,8±0,6 %.

As percentagens de ácidos gordos saturados variaram entre 7,02±0,01 % e 9,562±0,004 %, as dos ácidos gordos monoinsaturados variaram entre 66,226±0,009 % e 82,55±0,02 % e a dos polinsaturados entre 10,39±0,02 % e 24,455±0,007 %. Os parâmetros de qualidade analisados foram o índice de acidez que variou entre 2,4±0,5 mg KOH/g de óleo e 24,4±1,5 mg KOH/g de óleo, o índice de peróxidos variou entre 2,68±0,01 meq O₂/kg e 11,6±1,8 meq O₂/kg, o K₂₃₂ variou entre 96,0±0,10 e 167,0±0,10, o K₂₇₀ variou entre 8,2±0,10 e 19,8±0,10.

Após a obtenção dos extratos hidroalcoólicos determinou-se o conteúdo total de fenóis que variou entre 0,7±0,1 mg GAE/100 g e 5,9±0,5 mg GAE/100 g. Determinou-se também a atividade antioxidante, anti-inflamatória, a atividade enzimática, o poder redutor e a atividade antimicrobiana (ex: DPPH, superóxido, monóxido de azoto, tirosinase). Os valores de DPPH variaram entre 1,05±0,03 mg/mL e 7,48±0,09 mg/mL, os de superóxido

variaram entre $4,3 \pm 0,2$ mg/mL e $15,7 \pm 0,5$ mg/mL, os de monóxido de azoto variaram entre e $10,0 \pm 3,9$ % e $62,6 \pm 3,3$ %, os da tirosinase variaram entre $7,1 \pm 0,2$ % e $67,5 \pm 2,4$ %.

Palavras-chave

Amendoeira; Proteína; Lípidos; Hidratos de Carbono; Antioxidante; DPPH; Monóxido de Azoto; Conteúdo Total de Fenóis; Poder de Redução

Folha em branco

Abstract

The almond tree (*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb) is a tree that can reach 6 m in height under growing conditions and has its origin in the mountainous regions of Central Asia. At present, almond cultivation is distributed over 60 countries, particularly around the Mediterranean Sea, southwest Asia, Central Asia, southwest Russia, Ukraine, Caucasus, Himalayas, North America, South America, South Africa, and Australia.

In the nutritional characterization of almond kernel cultivars from Algarve region and cultivars from non-Algarve region, which grew under the same conditions, moisture, ash, protein, lipids, carbohydrates, and energy content were analysed. Some quality parameters such as acidity index, peroxide index, K232 and K270 were evaluated. Fatty acid profiles were evaluated by determining the monounsaturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, and saturated fatty acids content. The antioxidant/anti-inflammatory and anti-tyrosinase activities were also determined.

The protein contents varied between 17.03 ± 0.2 and 33.1 ± 0.8 g protein /100g and the cultivar with the highest content was Desmayo. The lipid content showed values between 36.47 ± 0.07 % and 59.25 ± 0.07 %, with the cultivar Lourencinha showing the highest content. Carbohydrates varied between the minimum and maximum values of 3.9 ± 1.6 % and 38.8 ± 0.6 %.

The percentages of saturated fatty acids ranged between 7.02 ± 0.01 % and 9.562 ± 0.004 %, those of monounsaturated fatty acids ranged between 66.226 ± 0.009 % and 82.55 ± 0.02 % and that of polyunsaturated between 10.39 ± 0.02 % and 24.455 ± 0.007 %. The quality parameters analysed were the acidity index that ranged between 2.4 ± 0.5 mg KOH/g of oil and 24.4 ± 1.5 mg KOH/g of oil, the peroxide index ranged between 2.68 ± 0.01 meq O₂/kg and 11.6 ± 1.8 meq O₂/kg, K232 varied between 96.0 ± 0.10 and 167.0 ± 0.10 , K270 varied between $8.2 \pm 0, 10$ and 19.8 ± 0.10 .

After obtaining the hydroalcoholic extracts, the total content of phenols, which varied between 0.7 ± 0.1 mg GAE/100 g and 5.9 ± 0.5 mg GAE/100 g, was determined. Antioxidant, anti-inflammatory, enzymatic activity, reducing power and antimicrobial activity (e.g. DPPH, superoxide, nitric oxide, tyrosinase) were also determined. DPPH values ranged between 1.05 ± 0.03 mg/mL and 7.48 ± 0.09 mg/mL, superoxide values ranged between 4.3 ± 0.2 mg/mL and 15.7 ± 0.5 mg/mL, nitric oxide ranged between and 10.0 ± 3.9 % and 62.6 ± 3.3 %, tyrosinase ranged between 7.1 ± 0.2 % and 67.5 ± 2.4 %.

Keywords

Almond; Protein; Lipids; Carbohydrates; Antioxidant; DPPH; Nitrogen Monoxide; Total Phenolic Content; Reducing Power

Folha em branco

Índice

1. Introdução	1
1.1. Taxonomia, Morfologia, Origem e Distribuição	1
1.2. Compostos bioativos na amêndoa	2
1.3. Compostos bioativos na matéria gorda	4
1.4. Objetivos de Estudo	5
2. Materiais e Métodos	6
2.1. Caracterização das amostras	6
2.2. Secagem, inceneração e digestão	7
2.3. Extração de Óleo	8
2.4. Qualidade Nutricional	9
2.4.1. Determinação da Proteína Total	9
2.4.2. Determinação dos Glúcidos e Teor Energético	9
2.5. Conteúdo de Ácidos Gordos	10
2.6. Índice de Acidez dos óleos	10
2.8. Absorvância no UV	11
2.9. Conteúdo de Fenóis	12
2.10. Atividade Antioxidante	12
2.10.1. Capacidade de Sequestração do Radical Livre DPPH	12
2.10.2. Capacidade de Sequestração do Radical Anião Superóxido	13
2.10.3. Capacidade de Sequestração do radical Monóxido de Azoto (\bulletNO) 14	
2.11. Poder de Redução	14
2.12. Testes de Inibição Enzimática	15
2.13. Atividade antimicrobiana	15
2.13.1. Microrganismos e meios de cultura	15
2.13.2. Teste de Difusão em Disco	15
2.14. Análise Estatística	16
3. Resultados e Discussão	17
3.1. Amêndoa	17
3.1.1. Análise de Componentes	17
3.1.2. Análise Mineral	20
3.2. Óleo	23
3.3. Solução Hidroalcoólica	28
3.3.1. Atividades Antioxidantes, Anti-Inflamatórias e Enzimáticas	28

3.3.2. Poder Redutor.....	32
3.3.3. Atividade Antimicrobiana.....	35
4. Conclusões e Perspetivas Futuras	37
5. Referências.....	39
6. Anexos.....	44

Folha em branco

Lista de Figuras

Figura 1 - Fotografia do fruto e respetivo miolo referente à cultivar (Lourencinha de Messines)....	7
Figura 2 - Fotografia do fruto e respetivo miolo referente à cultivar (Zé de Oliveira).....	7
Figura 3 - Fotografia do fruto e respetivo miolo referente à cultivar (Bonita do Calço).....	7
Figura 4 - Fotografia do fruto e respetivo miolo referente à cultivar (Patarata).....	7
Figura 5 – Análise em componentes principais da humidade, proteína, cinzas, óleo, hidratos de carbono e energia, com a sua interpretação considerando as cultivares estudadas.	20
Figura 6 – Análise em componentes principais da análise mineral; com a sua interpretação considerando as cultivares estudadas.....	23
Figura 7 – Análise em componentes principais dos parâmetros estudados no óleo, sendo que A e B referem-se estado oxidativo e C e D referem-se à composição oleica; com a sua interpretação considerando as cultivares estudadas.....	27
Figura 8 – Análise em componentes principais referente às atividades estudadas; com a sua interpretação considerando as cultivares estudadas.	32
Figura 9 - Resultados referentes ao poder redutor dos diferentes grupos de cultivares estudados..	33
Figura 10 – Continuação dos resultados obtidos referentes ao poder redutor dos diferentes grupos de cultivares estudados.....	34

Folha em branco

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Nome das amostras fornecidas com numeração e codificação que lhes foi atribuída. Adaptado de (CEAT 2020)	6
Tabela 2 - Programa utilizado para digerir as cinzas no digestor (modelo Discover SP-D; marca CEM).....	8
Tabela 3 - Resultados obtidos referentes à humidade, proteína, cinzas, óleo, hidratos de carbono e energia (valores apresentados como média n=2 e respetivos desvios padrão, e a análise estatística Fisher LSD $\alpha=0,005$).....	19
Tabela 4 - Análise mineral das cultivares estudadas (valores apresentados como média n=2 e respetivos desvios padrão, e a análise estatística Fisher LSD $\alpha=0,05$).....	22
Tabela 5 - Determinação do estado oxidativo do óleo virgem obtido (valores apresentados como média n=2 e respetivos desvios padrão, e a análise estatística Fisher LSD $\alpha=0,005$).....	24
Tabela 6 - Composição oleica das cultivares estudadas (valores apresentados como média n=2 e respetivos desvios padrão, e a análise estatística Fisher LSD $\alpha=0,005$).....	26
Tabela 7 - Atividades antioxidante, anti-inflamatória e enzimática (valores apresentados como média n=3 e respetivos desvios padrão, e a análise estatística Fisher LSD $\alpha=0,005$).....	31
Tabela 8 - Atividade antimicrobiana registada pelos extratos das cultivares (valores apresentados como média n=2 e respetivos desvios padrão, e a análise estatística Fisher LSD $\alpha=0,005$).....	36

Folha em branco

Lista de Acrónimos

SFA	Saturated fatty acids
MUFA	Mono unsaturated fatty acids
PUFA	Poly unsaturated fatty acids
CEAT	Centro de Experimentação Agrícola de Tavira
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
NBT	4-Nitro blue tetrazolium chloride
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
PMS	Phenazine methosulfate
PBS	Phosphate-Buffered Saline
DMSO	Dimetilsulfóxido
LSD	Least significant difference
HC	Hidratos de Carbono
PS	Peso seco
CN	Controlo negativo
CP	Controlo positivo

Folha em branco

Capítulo 1

1. Introdução

1.1. Taxonomia, Morfologia, Origem e Distribuição

A amendoeira é cientificamente designada por *Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb, mas também conhecida por várias outras denominações e que se consideram sinónimos. Apenas alguns exemplos retirados de "The Plant List": *Amygdalus communis* L., *Amygdalus dulcis* Mill., *Prunus amygdalus* var. *dulcis* (Borkh. ex DC.) Koehne, *Prunus amygdalus* Batsch., entre outros (The Plant List 2021). A amendoeira é uma espécie da família *Rosaceae* e subfamília *Prunoideae*.

Em termos morfológicos, a amendoeira é uma árvore que pode atingir 6 m de altura, em condições de cultivo, apresenta folha caduca de forma retangular e flores com 19-20 mm de comprimento, de cor branca a rosa-claro. A árvore quando jovem apresenta um tronco liso e que, ao longo do tempo, vai rachando. Isto é uma característica da espécie (Associação dos Jovens Agricultores de Portugal 2017; Karimi et al. 2020). O fruto é uma drupa, de forma ovoide-oblonga que tem no seu interior a semente que é geralmente considerada como um fruto seco, a amêndoa (Associação dos Jovens Agricultores de Portugal 2017).

A amendoeira tem origem nas regiões montanhosas da Ásia Central. Neste momento a cultura da amendoeira distribui-se por mais de 60 países, particularmente à volta do Mar Mediterrâneo, do sudoeste da Ásia, Ásia Central, sudoeste da Rússia, Ucrânia, Cáucaso, Himalaias, América do Norte, América do Sul, África do Sul e Austrália. Contudo, a importância comercial desta espécie não é igual para todos os países, destacando-se seis como os maiores produtores mundiais de amêndoa, que são por ordem decrescente: Estados Unidos da América do Norte, Espanha, Irão, Marrocos, Turquia e Itália (Karimi et al. 2020).

Na Península Ibérica, a cultura da amendoeira teve um grande incremento durante a ocupação árabe. Em Portugal, a cultura da amendoeira encontra-se principalmente no Sul (Baixo Alentejo e Algarve) e no Norte (Terra Quente em Trás-os-Montes) (Martins et al. 2003).

Ao longo do tempo, a amendoeira tem sofrido mutações naturais originando características distintas entre as árvores. São exemplos, a época de floração (muito tardia nas variedades provenientes da Crimeia e muito temporã nas variedades de origem norte africana e algarvia), ou a autofertilidade em que há variedades que são capazes de produzir frutos quando polinizadas com o seu próprio pólen (Neves e Miguel 2014). Nos países do Sul da Europa, esta característica foi detetada em Itália pela primeira vez e, mais tarde, em Portugal, mas muito provavelmente seria uma variedade de origem italiana por ter a designação Duro Italiano, cultivada no Barlavento Algarvio. Outras características podem

ocorrer naturalmente ou após melhoramento genético da amendoeira, que se transmitem hereditariamente, constituindo as diversas variedades com interesse por apresentarem, por exemplo, boa produtividade, ausência de dois miolos por amêndoa, miolo com boas características para uso industrial, floração tardia, autocompatibilidade, entre outras (Neves e Miguel 2014).

Com a substituição da amendoeira por outras culturas ou a substituição dos amendoais antigos por novas variedades, economicamente mais rentáveis, têm desaparecido as variedades tradicionais em vários países, restando apenas coleções de modo a conservar os recursos genéticos da espécie. Em Portugal, existe uma pequena coleção na Direção Regional de Agricultura e Pescas do Algarve (DRAPALG), em Tavira (Neves e Miguel 2014). Para a identificação e caracterização das diversas variedades de amendoeira em Portugal, têm sido feitos estudos físico-químicos dessas variedades, como rendimento de óleo, perfil dos ácidos gordos, (Martins et al. 1999), mas também utilizando marcadores moleculares como polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição; polimorfismo amplificado aleatoriamente de DNA (RAPD); sequência inter-simples repetições (ISSRs); polimorfismos de comprimento de fragmento amplificado; e isoenzimas (Cabrita et al. 2014; Martins et al. 2003). Estas técnicas têm permitido avaliar as relações genéticas interespecíficas e intraespecíficas de coleções de germoplasma de amendoeiras (Cabrita et al. 2014).

1.2. Compostos bioativos na amêndoa

Os nutrientes presentes no miolo da amêndoa são responsáveis pelas propriedades benéficas que têm sido descritas para este alimento (por exemplo, atividade anti-inflamatória, prevenção da doença cardiovascular, melhoram a função cognitiva, têm efeito benéfico sobre algumas doenças metabólicas). São muitos os compostos responsáveis por estes efeitos benéficos: ácidos gordos insaturados, proteínas, arginina, vitamina E, fitoesteróis, polifenóis, fibra alimentar, minerais como o potássio, cálcio, magnésio, entre outros (Gervasi et al. 2021). Apesar de alguns destes compostos terem atividade biológica com interesse para a saúde humana, muitos deles encontram-se em concentrações relativamente baixas (Roncero et al. 2020).

O conhecimento da composição química da amêndoa é de grande interesse sob o ponto de vista comercial, industrial e nutricional. A proporção dos vários constituintes varia em função de diversos fatores: variedade, sistema de cultivo, origem geográfica, entre outros. Poder-se-ão considerar na globalidade duas frações que constituem o miolo da amêndoa: a fração lipídica, predominantemente constituída por triglicéridos com predominância de ácidos gordos insaturados e na parte insaponificável onde se encontram os tocoferóis

(vitamina E), esqualeno, fitoesteróis, estanois, fosfolípidos e esfingolípidos; e a fração não lipídica onde estão incluídas as proteínas (globulinas, albuminas) e aminoácidos livres, hidratos de carbono, fibra alimentar, vitaminas, sais minerais (potássio, fósforo, sódio, ferro, cobre, manganésio, zinco) e compostos fenólicos (prantocianidinas, flavonoides e ácidos fenólicos (Roncero et al. 2020).

O miolo da amêndoa é um alimento rico em proteína, mas o seu conteúdo varia de acordo com a cultivar, condições atmosféricas e zona de cultivo (Pardo-Giménez et al. 2018). As percentagens de proteína variam entre 8,4% e 35,1% embora estas diferenças possam ser explicadas pelos métodos utilizados para a análise (Forcada et al. 2011; Kodad et al. 2013). Os aminoácidos livres representam uma baixa percentagem do conteúdo total de compostos com azoto, apenas 1%, o que se enquadra com o baixo valor de azoto não proteico; consequentemente o conteúdo total de aminoácidos corresponde aproximadamente ao conteúdo total de proteína (Roncero et al. 2020). Os aminoácidos livres mais comuns no miolo da amêndoa são os ácidos glutâmico e aspártico seguidos pela arginina (Grané-Teruel et al. 1999; Roncero et al. 2020).

Os hidratos de carbono presentes no miolo de amêndoa são açúcares solúveis, amido e outros polissacáridos (celuloses e hemiceluloses), que têm grande influência no trato intestinal com benefícios para a saúde. O conteúdo total de hidratos de carbono, em amêndoas, varia entre 14% a 28%. Os frutos secos são caracterizados por apresentarem valores baixos de açúcares solúveis, que variam entre 2,6% e 7,9%. O açúcar solúvel principal no miolo de amêndoa é a sacarose. Ao contrário de outros frutos e frutos secos, no miolo da amêndoa o amido não é a reserva principal de hidratos de carbono. A outra reserva de hidratos de carbono, a fibra, apresenta elevada variabilidade, recentemente alcançou-se os 5,81% de matéria seca (Roncero et al. 2020; Yada, Lapsley, e Huang 2011).

Encontram-se também no miolo de amêndoa, vários compostos voláteis e não voláteis, sendo os não voláteis os responsáveis pelo sabor do miolo, já os voláteis pelo aroma. Já foram detetados 17 compostos aromáticos nas amêndoas. Sabe-se que o miolo de amêndoa contém poucos compostos voláteis orgânicos em comparação com miolo seco com o processo de torragem. Alguns compostos voláteis presentes nas amêndoas são álcoois C1-C9, aldeídos C4-C10, benzaldeído e ácidos orgânicos, entre outros (Franklin e Mitchell 2019; Roncero et al. 2020).

O conteúdo de minerais determinado no miolo é comumente expresso em quantidade de cinzas, valor que em média representa cerca de 3 g de cinza/100 g de peso fresco. Contudo, já se registaram percentagens que vão desde um mínimo de 2,3% a um máximo de 5,0%. O total de elementos minerais é sensivelmente 60% do conteúdo de cinzas. Os minerais predominantes (macrominerais) no miolo de amêndoa incluem potássio, fósforo, cálcio e

magnésio; relativamente aos microminerais, encontram-se o sódio, ferro, cobre e zinco (Roncero et al. 2020).

São muitos os compostos fenólicos identificados na amêndoa, cujo teor é influenciado pela variedade e pelo tempo de extração num estudo efetuado com diversas variedades de amêndoa colhidas na Turquia. Por exemplo, os teores de ácido 3,4-di-hidroxibenzoico, ácido gálico, 1,2-di-hidroxibenzeno, isorramnetina, (+)-catequina, rutina variaram desde 1 a > 10 mg/100 g, dependendo da variedade e do tempo de extração (Ozcan et al. 2020). O stresse hídrico também tem influência na produção de compostos fenólicos, como por exemplo, a isorramnetina-3-O-rutinósido que aumenta com o stresse hídrico (Lipan et al. 2021).

1.3. Compostos bioativos na matéria gorda

No miolo de amêndoa há uma fração significativa de matéria gorda que, após extração, origina o óleo de amêndoa. O óleo de amêndoa é caracterizado como sendo bastante fluído e possuir um agradável e leve sabor doce, além disso o óleo de amêndoa é mais estável à oxidação que outros óleos vegetais. O conteúdo de óleo é variavelmente grande, oscilando entre 30,1% e 62,9% (Roncero et al. 2016a). Como qualquer óleo vegetal, o óleo de amêndoa é predominantemente constituído por triacilgliceróis (parte saponificável) onde se encontram muitos outros compostos (vitaminas lipossolúveis, fitoesteróis, fenóis, entre outros) (Roncero et al. 2020).

Os ácidos gordos dos triacilglicéris constituintes do óleo de amêndoa têm entre 14 e 20 átomos de carbono (C₁₄-C₂₀), que podem ser ácidos gordos saturados (SFAs, do inglês *saturated fatty acids*), ácidos gordos mono-insaturados (MUFAs, do inglês *monounsaturated fatty acids*) e ácidos gordos polinsaturados (PUFAs, do inglês *polyunsaturated fatty acids*). Os ácidos gordos que são predominantes no óleo de amêndoa são cinco: ácido oleico, ácido linoleico, ácido palmítico, ácido palmitoleico e ácido esteárico (Roncero et al. 2016b). Também aqui e como seria expectável, a variabilidade química ocorre dependendo maioritariamente do genótipo da amêndoa, mas pode também ser afetada pelo grau de maturidade do miolo e pelas condições ambientais tais como localização, clima e colheita (Kodad et al. 2014). Há outros lípidos constituindo um grupo mais pequeno, mas com enorme importância do ponto de vista biológico e nutricional. Estes compostos consistem em tocoferóis, fosfolípidos (esfingolípidos, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol e fosfatidiletanolamina), esteróis, fitoesteróis, esqualeno e terpenoides (Roncero et al. 2016a). Os tocoferóis têm um papel importante nos parâmetros de qualidade do óleo de amêndoa protegendo-o contra a oxidação lipídica. Na sua constituição podem-se encontrar 4 tocoferóis (α -, β -, γ -, e δ -tocoferol) e 4 tocotrienóis (α -, β -, γ -e δ -tocotrienol) (Alasalvar e Pelvan 2011).

Comparando com outros óleos provenientes de frutos secos, o óleo de amêndoa apresenta uma importante quantidade de fitoesteróis, sendo o β -sitosterol o fitoesterol com maior representatividade. O esqualeno também se deteta no óleo de amêndoa com uma concentração que varia entre 37,9 até 114,2 $\mu\text{g/g}$ (Fernandes et al. 2017).

1.4 Objetivos de Estudo

Um dos objetivos do presente estudo foi o de avaliar a qualidade nutricional das 28 cultivares principais da região do Algarve e compará-las com algumas cultivares oriundas de outros países, presentes no Centro de Experimentação Agrária de Tavira (CEAT).

Neste estudo, pretendeu-se também obter e caracterizar o óleo de amêndoa proveniente das 28 cultivares, dentro das quais estão presentes as cultivares principais da região do Algarve e cultivares comerciais oriundas de países tais como Espanha, Itália e França. Foi também objetivo do trabalho estudar os extratos hidroalcoólicos das amêndoas e as suas capacidades anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas bem como a capacidade de inibir a enzima tirosinase. Este trabalho pode contribuir para incentivar o cultivo de amêndoa algarvia juntamente com outras variedades já bem instaladas no mercado nacional e internacional.

Capítulo 2

2. Materiais e Métodos

2.1. Caracterização das amostras

As diversas variedades de amêndoas, quer nacionais quer internacionais, utilizadas no presente trabalho (Tabela 1) foram fornecidas pelo Centro de Experimentação Agrária de Tavira (CEAT) (CEAT 2020). As amêndoas foram posteriormente descascadas ficando dois grupos: miolo e casca. De cada variedade, uma parte de miolo de amêndoa foi enviada para a Escola Superior Agrária de Castelo Branco para serem analisar. Os óleos vegetais obtidos a partir das amêndoas depois de avaliados alguns parâmetros químicos foram enviados para Escola Superior Agrária de Castelo Branco para avaliar o perfil de ácidos gordos. Ainda parte dos óleos vegetais foi enviado para Universidade de Beira Interior para avaliar a atividade antimicrobiana.

Tabela 1 - Nome das amostras fornecidas com numeração e codificação que lhes foi atribuída. Adaptado de (CEAT 2020)

Nome da Amostra	Numeração	Local	Código
Coco	2	Algarve	Al2
Cacela / Manta Rota	4	Algarve	Al4
Boa Casta	7	Algarve	Al7
Bonita	8	Algarve	Al8
Galamba	11	Algarve	Al11
Zé de Oliveira	12	Algarve	Al12
Molar Sales	14	Algarve	Al14
Lourencinha	19	Algarve	Al19
Lourencinha de Messines	21	Algarve	Al21
Guara	29	Espanha	Es29
Marcona	35	Espanha	Es35
Cristomorto	36	Itália	It36
Desmayo	37	Espanha	Es37
Duro Amarelo	43	Algarve	Al43
Zé Dias Miúdo	47	Algarve	Al47
Molar de Alcaria	54	Algarve	Al54
Bonita do Calço	65	Algarve	Al65
Duro Italiano	74	Algarve	Al74
Patarata	76	Algarve	Al76
Convento	86	Algarve	Al86
Ferralise	87	França	Fr87
Masbovera	96	Espanha	Es96
Francoli	98/2	Espanha	Es98/2
Lauranne	99	França	Fr99
Duro da Estrada	112	Algarve	Al112
Bonita de S. Brás	115	Algarve	Al115
Ferragnés	119	França	Fr119
Ferraduel	120	França	Fr120

Nas Figura 1-4 estão representadas algumas das amostras que foram fornecidas para este estudo.



Figura 1 - Fotografia do fruto e respetivo miolo referente à cultivar (Lourencinha de Messines).



Figura 2 - Fotografia do fruto e respetivo miolo referente à cultivar (Zé de Oliveira).



Figura 4 - Fotografia do fruto e respetivo miolo referente à cultivar (Patarata).



Figura 3 - Fotografia do fruto e respetivo miolo referente à cultivar (Bonita do Calço).

2.2. Secagem, inceneração e digestão

Foi selecionado o miolo de 6 amêndoas que foi utilizado para efetuar dois replicados de análise, cada replicado contendo o miolo de três amêndoas. Estas amostras foram submetidas a um processo de secagem a 105 °C durante 30 horas, usando a estufa Incubator Serie FD Model 23 from Binder Ltd (Tuttlingen, Germany) (Boutoub et al. 2020).

Determinou-se neste passo a percentagem de humidade presente nas cultivares em estudo, para tal, seguiu-se a seguinte fórmula.

$$\%Humidade = \frac{(\text{Peso fresco (g)} - \text{Peso Seco (g)})}{\text{Peso fresco (g)}} \times 100$$

As amostras foram armazenadas num exsiccador até análise seguinte (Boutoub et al. 2020). A incineração das amostras foi efetuada em mufla a 500 °C durante 6 horas utilizando cadinhos de porcelana, previamente secos para evitar a presença de humidade no seu interior. O miolo de amêndoa secado foi cortado e macerado, antes de o colocar no cadinho, de modo a obter uma maior superfície de contacto. As cinzas obtidas foram preparadas para a digestão. As cinzas foram removidas dos cadinhos e transferidas para tubos de Falcon de 15 mL e armazenadas no exsiccador.

Para o processo de digestão foram adicionados às cinzas, 30 mL de ácido nítrico 60% e 25 mL de peróxido de hidrogénio 30% para sua dissolução (Rodrigues 2019). O material resultante foi armazenado usando balões volumétricos de 25 mL. De modo a completar a digestão recorreu-se a um sistema de digestão através de aquecimento por micro-ondas pressurizadas (modelo Discover SP-D 80; marca CEM) em tubos de quartzo de 80 mL (Tabela 2) (Rodrigues 2019).

Tabela 2 - Programa utilizado para digerir as cinzas no digestor (modelo Discover SP-D; marca CEM).

Passo	Temperatura (°C)	Tempo de Rampa (min:s)	Tempo do Passo (min:s)	Pressão (PSI)	Agitação Magnética
1	ambiente (25°C)	-	00:15	<50	Moderada
2	180	04:00	02:00	300	Moderada

2.3. Extração de Óleo

O óleo foi extraído a partir do miolo das amêndoas por extração com extrator Soxhlet usando hexano como solvente. Foram utilizados cartuchos de celulose 25 x 100 mm da marca Filtres Fioroni, França para colocação das amostras a analisar. Depois da extração foi utilizado um evaporador rotativo para evaporar o solvente a uma temperatura de 50°C, para recuperação do óleo (Ozcan et al. 2020).

O óleo obtido foi pesado para determinação do rendimento e pipetado para pequenos tubos de vidro de 5 mL. O óleo extraído ficou armazenado nesses tubos a uma temperatura -4 °C, até utilização futura.

2.4. Qualidade Nutricional

2.4.1. Determinação da Proteína Total

Para a determinação da proteína total pelo método de Kjeldahl, foi necessário determinar primeiramente o teor de azoto presente nas amostras. Para este procedimento utilizou-se o resíduo resultante da extração do óleo. Pesou-se 1 g para papel de filtro.

Nos tubos de vidro utilizados para a digestão foram colocadas as amostras envolvidas em papel de filtro juntamente com o catalisador (mistura contendo: sulfato de potássio, sulfato de cobre pentahidratado e selênio) e 25 mL de ácido sulfúrico 95%. Após a digestão, adicionaram-se 10 mL de água destilada. Transferiu-se todo o líquido para os tubos de Kjeldahl para efetuar a destilação. Num erlenmeyer de 250 mL preparou-se uma solução contendo 10 mL de ácido bórico 4% juntamente com 3 gotas de indicador misto (vermelho de metila $6,6 \times 10^{-4}$ g/mL e verde de bromocresol $3,0 \times 10^{-4}$ g/mL). De seguida efetuou-se a destilação recorrendo ao destilador Büchi 315 Sotel, Lisboa, adicionou-se hidróxido de sódio a 35% até se obter 100 mL de destilado. Seguiu-se então a titulação, na qual se utilizou como titulante ácido clorídrico 0,5 M de modo a quantificar o teor de azoto, de acordo com a seguinte fórmula, onde os resultados são expressos em g/100 g de peso seco (p.s.) (Trindade 2016).

$$\text{Azoto (g/100g de p.s.)} = \frac{\text{Volume de HCL (mL)} \times M\left(\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right) \times F \times MM\left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)}{\text{Peso Seco (g)}};$$

Onde:

M - Molaridade do ácido clorídrico usado;

F - Fator de correção (0,1);

MM - Massa molar do ácido clorídrico.

Após a quantificação do teor de azoto seguiu-se a determinação da proteína total, para tal considerou-se a seguinte fórmula (Summo et al. 2018; USDA Food Database U.S. Department of Agriculture 2021):

$$g \text{ Proteína Bruta}/100g = \text{Azoto (g/100g de p.s.)} \times 5,18.$$

2.4.2. Determinação dos Glúcidos e Teor Energético

Após a determinação dos parâmetros anteriores prosseguiu-se para a determinação da percentagem de glúcidos presentes no miolo de amêndoa. A quantificação dos glúcidos foi

efetuada através da fórmula seguinte (Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia 2011):

$$\% \text{ de Glúcidos} = 100 - (\% \text{ de Cinzas} + \% \text{ de Proteína} + \% \text{ da Humidade} + \% \text{ de Lípidos});$$

Ao obter o valor de glúcidos é possível determinar o valor energético das amostras de amêndoa em estudo pela seguinte fórmula (Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia 2011).

$$\text{Teor Energético} = 4 \times \% \text{ de Proteína} + 4 \times \% \text{ de Glúcidos} + 9 \times \% \text{ de Lípidos}$$

2.5. Conteúdo de Ácidos Gordos

O teor em ácidos gordos presentes nos óleos foi determinado recorrendo a cromatografia de fase gasosa Hewlett Packard 6890, equipado com detetor de ionização de chama (FID, do inglês *flame ionization detector*), injetor automático e coluna capilar coluna SP 2380™ da Supelco (60 m x 0,25 mm x 0,20 mm) (Zahran, Abd-Elsaber, and Tawfeuk 2020). O gás utilizado para efetuar o arrastamento da amostra foi hélio; e o gás de combustível uma mistura de hidrogénio e ar.

Para esta análise, as amostras foram sujeitas previamente a uma derivatização que a seguir se descreve o protocolo. Para realizar essa determinação pesou-se 1 g de óleo adicionou-se 10 mL de *n*-heptano e 0,5 mL de solução metanólica de hidróxido de potássio 2N e agitou-se durante 30 segundos de modo a permitir a transesterificação. De seguida procedeu-se à respetiva determinação do conteúdo de ésteres metílicos de ácidos gordos, de acordo com (Peres et al. 2016).

2.6. Índice de Acidez dos óleos

Para a determinação do índice de acidez foi utilizado o óleo de amêndoa extraído no passo 2.3. Foram seguidos os protocolos e as indicações presentes na Farmacopeia Portuguesa (2009), com algumas modificações do protocolo. Foi pesado cerca de 1 g do óleo extraído para erlenmeyers de 100 mL. De seguida foi adicionado 5 mL de uma mistura composta por álcool e éter. De modo a poder ser titulada, a essa mistura foram adicionadas 6 gotas do indicador fenolftaleína. Usou-se o hidróxido de potássio (KOH) como titulante com uma

concentração de 0,1M com uma redução 1:5. O índice de acidez (IA) foi determinado com recurso à seguinte fórmula (Sakar et al. 2021).

$$IA = \frac{5,61 \frac{g}{mL} \times Volume\ de\ KOH\ usado\ (mL)}{Peso\ do\ óleo\ (g)}$$

2.7. Índice de Peróxidos dos óleos

Para a determinação do índice de peróxidos (IP), seguiu-se o protocolo descrito na Farmacopeia Portuguesa (2008), com algumas. Foi pesado 0,5 g do óleo, adicionando-se, de seguida, 5 mL de uma mistura de ácido acético e clorofórmio (3:2). Acrescentaram-se 0,2 mL de iodeto de potássio e colocou-se no escuro durante 5 minutos. Passado esse tempo adicionaram-se 7,5 mL de água destilada e 6 gotas de cozimento de amido. Para efetuar a titulação utilizou-se como titulante o tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$) 0,01 M. O índice de peróxidos foi determinado utilizando a seguinte fórmula (Sakar et al. 2021).

$$IP = \frac{10 \times Volume\ de\ Na_2S_2O_3\ (mL)}{Peso\ do\ óleo\ (g)}$$

2.8. Absorvância no UV

Os valores de absorvância nos comprimentos de onda 232 e a 270 nm são valores importantes para avaliar a qualidade do óleo. Assim, os hidroperóxidos absorvem a 232 nm, ao passo que os produtos de oxidação secundária absorvem a 270 nm. Dienos e trienos conjugados formados durante o processo de refinação também absorvem nestes comprimentos de onda. Para ter um óleo de boa qualidade é desejável ter estes valores baixos (Pedrosa 2010). O protocolo seguido foi o descrito na Farmacopeia Portuguesa (2009). Para tal, pesou-se 0,1 g de amostra em balões volumétricos de 10 mL. Inicialmente, a amostra foi dissolvida em ciclohexano. De seguida, fez-se a leitura das absorvâncias das amostras a dois comprimentos de onda, 232 nm e 270 nm, utilizando o espectrofotómetro UV-Vis (Ultrospec 1100 pro, Amersham Biosciences, Reino Unido) e cuvets de quartzo com um diâmetro (c) de 1 cm. Determinou-se a concentração das amostras para se poder determinar respetivamente o K232 e o K270. Dado que o seu rácio K232/K270 têm de ser superior a 7. As seguintes formulas foram as utilizadas para determinar essas constantes (Sakar et al. 2021).

$$K232 = \frac{Absorvância\ 232\ nm}{Concentração\ de\ óleo\ \left(\frac{g}{mL}\right) \times c} \quad K270 = \frac{Absorvância\ 270\ nm}{Concentração\ de\ óleo\ \left(\frac{g}{mL}\right) \times c}$$

Em que:

$$\frac{K232}{K270} > 7$$

2.9. Conteúdo de Fenóis

O resíduo resultante do miolo de amêndoa obtido na extração do óleo, no passo 2.3, foi reutilizado neste estudo para calcular o conteúdo fenólico das amostras. Foi pesado cerca de 1 g em erlenmeyers de 100 mL e adicionaram-se 30 mL de etanol a 70%. Posteriormente, os erlenmeyers foram colocados num agitador Incubator Hood TH 15 (Edmund Bühler GmbH) durante 40 h, de seguida, foram colocados em tubos de Falcons de 50 mL para poderem ser centrifugados. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e transferido para outro tubo de Falcon (El-Guendouz et al. 2018).

O conteúdo fenólico nos extratos de amêndoa foi determinado colorimetricamente pelo reagente de Folin-Ciocalteu (El-Guendouz et al. 2018). Para tal, retiraram-se 150 µL de amostra dos tubos de falcon que continham o sobrenadante e colocaram-se em eppendorfs de 1,5 mL. Adicionaram-se aos eppendorfs 250 µL de reagente de Folin-Ciocalteu a uma concentração de 10% e 200 µL NaCO₃ (Miguel et al. 2010). Para as amostras em que ocorreu uma ligeira turvação, as amostras foram centrifugadas utilizando a microcentrifuga (Mikro 200, Hettich, Alemanha). O comprimento de onda utilizado para determinar a absorvância foi 765 nm usando um leitor de microplacas (TECAN – Infinite M200, Austria). O conteúdo total fenólico nos extratos foi determinado utilizando o ácido gálico como padrão num intervalo de concentrações (0,250 mg/mL a 0,001 mg/mL). O total de fenóis extraídos foi expresso como mg equivalentes de ácido gálico (GAE – do inglês, *gallic acid equivalents*) por 100 g de amostra (mg GAE/100 g) (Čolić et al. 2017).

2.10. Atividade Antioxidante

2.10.1. Capacidade de Sequestração do Radical Livre DPPH

Para este estudo, utilizaram-se como amostras os extratos obtidos no passo 2.9. Inicialmente, preparou-se a solução DPPH a uma concentração de 0,005 g/200 mL em etanol 96% (Smail et al. 2011). De modo a se poder utilizar essa solução foi necessário fazer uma diluição de modo a ter de obter um valor de absorvância entre 0,7 e 0,9 no comprimento de onda de 517 nm.

O procedimento consistiu em adicionar um determinado volume (100 µL, 75 µL, 50 µL, 25 µL) de amostra considerando o seu conteúdo fenólico (El-Guendouz et al. 2018) à solução de DPPH previamente preparada de modo a obter o volume total de 300 µL. Fizeram-se três replicados para todas as amostras. Após a leitura, que foi realizada num leitor de microplacas (TECAN – Infinite M200, Áustria) a um comprimento de onda de 517 nm, a concentração do extrato que origina 50% de inibição (IC₅₀) foi calculada utilizando um gráfico considerando a percentagem de efeito sequestração *vs* a concentração do extrato (El-Guendouz et al. 2018). A percentagem do efeito de sequestração foi calculada de acordo com a fórmula: %I= [(A₀-A₁/A₀) x 100], onde A₀ corresponde a absorvância do controlo negativo (branco: contém o mesmo volume de amostra, neste caso etanol 70%, e de solução DPPH) e A₁ corresponde à absorvância da amostra. A partir do gráfico obtido foi possível determinar os valores de IC₅₀ (concentração de extrato capaz de inibir em 50% o radical livre DPPH) (Barros et al. 2007).

2.10.2. Capacidade de Sequestração do Radical Anião Superóxido

Para a sequestração do anião superóxido (Sp), utilizaram-se como amostras os extratos obtidos no passo 2.9. Prepararam-se os reagentes necessários, azul de nitrotetrazólio (NBT, do inglês *Nitro blue tetrazolium chloride*), dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide disodium salt hydrate*) e metossulfato de fenazina (PMS do inglês *phenazine methosulfate*) (El-Guendouz et al. 2018). De forma a se poder realizar o estudo seria necessário obter uma absorvância entre 0,7 e 0,9 ao comprimento de onde de 560 nm.

O procedimento consistiu em adicionar um determinado volume fixo da amostra; mas no decorrer do ensaio verificou-se que se teriam de utilizar 3 volumes diferentes (80 µL, 100 µL, 150 µL) devido ao seu conteúdo fenólico (El-Guendouz et al. 2018). Para tal foi necessário alterar o protocolo de acordo com esses volumes utilizados; para as amostras de 80 µL adicionaram-se 30 µL de NBT, 30 µL de NADH, 130 µL de etanol 70% e 30 µL de PMS; para as amostras de 100 µL adicionaram-se 50 µL de NBT, 50 µL de NADH, 500 µL de etanol 70% e 50 µL de PMS; para as amostras de 150 µL adicionaram-se 50 µL de NBT, 50 µL de NADH e 50 µL de PMS (El Kharraf et al. 2021). Três replicados foram considerados para todas as amostras. Após a leitura, que foi realizada num leitor de microplacas (TECAN – Infinite M200, Áustria) a um comprimento de onda de 560 nm, a concentração do extrato que origina 50% de inibição (IC₅₀) foi calculada utilizando um gráfico considerando a percentagem de efeito sequestração *vs* a concentração do extrato (Barreira et al. 2008). A percentagem do efeito de sequestração foi calculada de acordo com a fórmula: %I= [(A₀-A₁/A₀) x 100], onde A₀ corresponde a absorvância do controlo negativo (branco: contém o

mesmo volume de amostra, neste caso etanol 70%, e os restantes reagentes) e A_1 corresponde à absorvância da amostra. A partir do gráfico obtido foi possível determinar os valores de IC_{50} (concentração de extrato capaz de inibir em 50% o radical anião Superóxido)(Ho et al. 2010).

2.10.3. Capacidade de Sequestração do radical Monóxido de Azoto (\bullet NO)

A atividade de sequestração do monóxido de azoto (NO) foi determinada a partir do protocolo previamente descrito por (Ho et al. 2010), com pequenas alterações. Neste método colocaram--se 400 μ L de amostra onde se adicionaram 400 μ L de nitroprussiato de sódio 10 mM em PBS 0,1 % (do inglês *Phosphate Buffered Saline*) em eppendorfs de 2 mL que foram posteriormente deixados na presença de luz à temperatura ambiente durante 60 min (El-Guendouz et al. 2018). Após esse passo, foram retirados 360 μ L dessa mistura e colocados em microplacas de 96 poços. Adicionou-se 40 μ L do reagente de Griess a cada poço de modo a perfazer 400 μ L. A placa também foi deixada à temperatura ambiente durante 30 min. A leitura de absorvância foi realizada a 548 nm (Boutoub et al. 2020). A percentagem do efeito de sequestração foi calculada de acordo com a fórmula: $\%I = [(A_0 - A_1/A_0) \times 100]$, onde A_0 corresponde a absorvância do controlo negativo (branco: contém o mesmo volume de amostra, neste caso etanol 70%, e os restantes reagentes) e A_1 corresponde à absorvância da amostra.

2.11. Poder de Redução

O poder de redução foi determinado como previamente descrito em (Laskar et al. 2010), embora tenham sido necessárias pequenas alterações ao protocolo. Em suma, a 200 μ L dos estratos foram adicionados 500 μ L de tampão fosfato de sódio a 0,2 M pH=6, 500 μ L de ferricianeto de potássio a 1%. A mistura foi depois deixada a 50°C durante 20 minutos, após este período adicionaram-se 500 μ L de ácido tricloroacético a 10%. Retiraram-se 500 μ L da posterior mistura, à qual foram adicionados 500 μ L de água destilada e 100 μ L de cloreto férrico a 0,1%. Após a leitura da absorvância realizada num leitor de microplacas (TECAN – Infinite M200, Áustria) a um comprimento de onda de 700 nm, obtiveram-se os gráficos representativos do poder de redução considerando a absorvância *vs* a concentração do extrato (El-Guendouz et al. 2018).

2.12. Testes de Inibição Enzimática

A ação inibitória dos extratos hidroalcoólicos na atividade da tirosinase foi avaliada como previamente descrita (Abd El-Hady et al. 2014), com pequenas alterações. Em suma, 105 µL de tampão fosfato (50 mM, pH 6.5), 75 µL de amostra e 60 µL de solução tirosinase de cogumelo (500 U/mL) foram adicionados a uma microplaca de 96 poços. A mistura foi incubada a 25 °C durante 40 min. Após a incubação, adicionaram-se 60 µL de solução L-DOPA a 5 mM e a quantidade de dopacromo produzida na mistura reacional foi determinada espectrofotometricamente a 492 nm num leitor de microplacas. A percentagem de inibição da atividade da tirosinase foi determinada (El-Guendouz et al. 2016).

2.13. Atividade antimicrobiana

2.13.1. Microrganismos e meios de cultura

Para os ensaios de atividade antimicrobiana foram considerados os seguintes microrganismos: sete estirpes de bactérias (Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* LMG 16779 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; Gram-negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, e *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311) e duas estirpes de leveduras (*Candida albicans* ATCC 90028 e *Candida tropicalis* ATCC 750). As culturas stock foram preparadas e armazenadas com glicerol a 20% a -80 °C. As estirpes foram subcultivadas numa placa de agar apropriada 24 h antes dos ensaios. O meio de cultura Brain Heart Infusion Agar (BHI) foi utilizado para o crescimento das espécies bacterianas e o meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) foi utilizado para as leveduras (Luís et al. 2014).

2.13.2. Teste de Difusão em Disco

A atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos (ponto 2.9) foi determinada pelo teste de difusão em disco, seguindo os métodos-padrão descritos pelo Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI). Para as bactérias foi seguida a norma M2-A8 e para as leveduras a norma M44-A2. Inicialmente, os extratos foram evaporados à secura utilizando um evaporador rotativo a 45 °C, em condições de pressão reduzida e foram posteriormente dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) estéril a uma concentração de 200 mg/mL. Para a preparação do inóculo fez-se uma suspensão direta, em solução salina estéril (NaCl, 0,85%, p/v) de colónias isoladas selecionadas numa placa de agar em meio não seletivo com 18-24 h. Esta suspensão foi ajustada para uma turbidez de 0,5 unidades de McFarland tendo sido utilizada para a inoculação das placas através do método do espalhamento recorrendo a uma zaragatoa O meio de Muëller-Hinton Agar (MHA) foi utilizado para a inoculação das

bactérias e o meio MHA suplementado com 2% (p/v) de glucose e 0,5 µg/mL de azul de metileno foi utilizado para a inoculação das leveduras. Os discos de celulose estéreis (6 mm de diâmetro) foram impregnados com 10 µL das soluções dos extratos (2 mg extrato/disco). O controlo negativo foi preparado usando DMSO (10 µL/disco), que já tinha sido utilizado para dissolver as amostras. O controlo positivo utilizado para as bactérias foi a tetraciclina (30 µg/disco) e para as leveduras foi a anfotericina B (25 µg/disco). As placas inoculadas com bactérias foram incubadas a 37 °C por 24 h e com as leveduras por 48 h. Após a incubação, todas as placas foram verificadas para existência de halos de inibição e os seus diâmetros foram medidos em milímetros utilizando um paquímetro digital. Todos os ensaios foram realizados em triplicados independentes (Domingues et al. 2014).

2.14. Análise Estatística

Para todos os testes foram considerados uma amostra de cada cultivar de amêndoa e todas as experiências foram realizadas em triplicado. Os resultados foram expressos como valor médio e erro padrão da média. As diferenças entre os cultivares de amêndoa foram analisadas usando a Análise de Variância simples (ANOVA) seguido pelo teste LSD Fisher com $\alpha = 0,05$. Este tratamento foi efetuado usando o programa Statistica 7.

Capítulo 3

3. Resultados e Discussão

3.1. Amêndoa

3.1.1. Análise de Componentes

No miolo de amêndoa foram estudados os parâmetros indicados na Tabela 3. No que respeita à humidade, os valores variaram entre $0,3 \pm 0,2$ e $10,0 \pm 2,5$ %. As cultivares que se destacaram pelos valores mais elevados de humidade foram a Molar de Alcaria, a Lourencinha de Messines e a Cacela/Manta Rota. Valores que se afastam dos encontrados na literatura, de acordo com outros trabalhos (Martins et al. 1999). Estes dados mostram como este parâmetro é bastante influenciado pelo tipo de cultivar. Esta variabilidade encontra-se também presente no trabalho (Summo et al. 2018) para as cultivares Francoli, Marcona e Ferragnés.

Quanto à proteína presente no miolo das amêndoas, os resultados variaram entre $17,03 \pm 0,2$ e $33,1 \pm 0,8$ g proteína/100g. As cultivares que se distinguiram foram a Desmayo $33,1 \pm 0,8$ g proteína/100g, a Bonita do Calicho $31,5 \pm 1,7$ g proteína/100g, a Duro Italiano $30,3 \pm 1,3$ g proteína/100g e a Marcona $30,1 \pm 1,9$ g proteína/100g. Os miolos de amêndoa destas cultivares que são do Algarve e Espanha apresentam um elevado teor de proteínas (Tabela 3). Os dados encontrados estão dentro dos valores referidos por outros autores para outras cultivares, tais como Boa Casta, Duro Estrada, Ferragnés, Bonita de S. Brás, Bonita, Duro Amarelo, Francoli e Marcona $22,5$ - $31,3$ g proteína/100g (Cordeiro et al. 2001); $18,8$ - $22,5$ g proteína/100g (Barreca et al. 2020).

O teor em cinzas variou entre $3,1 \pm 0,4$ e $3,8 \pm 0,4$ %, sendo as cultivares Cacela/Manta Rota, a Convento e a Ferragnés, as que apresentaram valores mais elevados. Estes dados estão de acordo com o previamente descrito (Cordeiro et al. 2001) para as cultivares Boa Casta, Duro Estrada, Ferragnés, Bonita de S. Brás, Bonita, Duro Amarelo.

O óleo extraído do miolo variou entre $36,47 \pm 0,07$ %, para a cultivar Convento e $59,25 \pm 0,07$ %, para a cultivar Lourencinha (Tabela 3). Esta variação no teor de gordura vai de encontro aos valores detetados para cultivares portuguesas (Yada et al. 2011).

Os hidratos de carbono (HC) variaram entre os valores mínimo e máximo de $3,9 \pm 1,6$ % e $38,8 \pm 0,6$ %, resultados que demonstram uma grande diferença entre as cultivares estudadas. Destacam-se as cultivares Convento, Ferraduel e Guara por apresentarem os valores mais elevados, com percentagens a rondar os 30% (Tabela 3). A grande variabilidade também já foi descrita por outros autores para outras cultivares, embora um valor de 3,9% se apresente como uma exceção (Barreira et al. 2012; Roncero et al. 2020).

De acordo com Yada et al. (2011) cultivares portuguesas de amêndoa apresentam entre 2,5 a 7,1% de açúcares solúveis.

Determinados todos os parâmetros, calculou-se a energia para cada amostra. Os valores obtidos variaram entre os valores máximo e mínimo de $664,9 \pm 0,0$ e $483,4 \pm 3,3$, respetivamente (Tabela 3), que estão de acordo com (Karimi et al. 2020). Dos resultados pôde verificar-se que as cultivares Lourencinha, Bonita do Calião, Zé de Oliveira e Galamba são as que apresentam um teor energético maior quando comparadas com as restantes cultivares.

Na Figura 5 encontra-se representada os resultados da análise em componentes principais relativa à humidade, proteína, cinzas, óleo, hidratos de carbono e energia de cada cultivar estudada. O factor 1 que explica 56% da variabilidade total, explica a variação observada entre o teor energético, lípidos, hidratos de carbono e cinzas, sendo as amostras com teores mais elevados de lípidos e energético apresentam menor conteúdo em hidratos de carbono e cinzas. O factor 2 (que representa 23 % da variação total) é explicado pela variação da humidade e teor em proteína. As amostras Al8 (Bonita), Al19 (Lourencinha) e Al12 (Zé de Oliveira) e Al65 (Bonita do Calião) formam o grupo das amostras com valores mais elevados de lípidos e teor energético e menores teores de hidratos de carbono e cinzas. Relação inversa é observada para a amostra Al86 (Convento) a que apresenta maior teor de hidratos de carbono e composição nutricional diferenciadora das restantes amostras. O grupo de amostras com teores mais elevados de humidade e proteína é formado pelas amostras Al43 (Duro Amarelo), Al54 (Molar de Alcaria), Al4 (Cacela/Manta Rota) e Es37 (Desmayo).

Tabela 3 - Resultados obtidos referentes à humidade, proteína, cinzas, óleo, hidratos de carbono e energia (valores apresentados como média n=2 e respetivos desvios padrão, e a análise estatística Fisher LSD $\alpha=0,005$).

Cultivar	Humidade (%)	Proteína (%)	Cinzas (%)	Óleo (%)	HC (%)	Energia (kcal)
Coco	5,6±0,0 ^{cd}	25,4±2,9 ^c	3,4±0,2 ^{ab}	45,35±0,07 ^f	20,2±2,6 ^{de}	590,4±0,9 ^{bc}
Cacela/Manta Rota	6,2±1,1 ^d	27,8±3,1 ^{cd}	3,68±0,06 ^b	48,05±0,07 ^g	14,3±4,1 ^{bc}	600,6±4,1 ^c
Boa Casta	3,3±0,6 ^b	25,7±0,6 ^c	3,31±0,07 ^{ab}	51,85±0,07 ⁱ	15,9±1,1 ^c	632,7±2,5 ^{de}
Bonita	5,1±0,0 ^{cd}	24,0±0,2 ^{bc}	3,1±0,4 ^a	55,25±0,07 ^{jk}	12,6±0,6 ^{bc}	643,3±1,7 ^{def}
Galamba	2,9±0,4 ^b	23,2±0,3 ^b	3,2±0,5 ^{ab}	54,35±0,07 ^j	16,3±0,2 ^c	647,1±0,5 ^{ef}
Zé de Oliveira	4,5±1,9 ^{cd}	26,2±4,0 ^c	3,1±0,2 ^a	57,05±0,07 ^l	9,1±6,0 ^{ab}	654,6±8,4 ^{ef}
Molar Sales	4,3±1,1 ^{cd}	29,7±0,7 ^{de}	3,3±0,2 ^{ab}	51,75±0,07 ⁱ	11,0±1,7 ^b	628,3±3,7 ^{de}
Lourencinha	4,7±0,0 ^{cd}	22,9±0,7 ^b	3,1±0,0 ^a	59,25±0,07 ^m	10,1±0,6 ^b	664,9±0,0 ^f
Lourencinha de Messines	5,9±0,8 ^d	26,0±0,7 ^c	3,3±0,1 ^{ab}	49,00±0,07 ^{gh}	15,7±0,1 ^c	613,0±3,5 ^{cd}
Guara	2,8±0,0 ^b	19,5±2,6 ^{ab}	3,5±0,1 ^{ab}	44,36±0,07 ^e	29,8±2,4 ^f	619,9±0,5 ^d
Marcona	4,1±1,3 ^c	30,1±1,9 ^{de}	3,35±0,07 ^{ab}	49,25±0,07 ^h	13,3±3,2 ^{bc}	616,4±4,9 ^{cd}
Cristomorto	5,33±0,05 ^{cd}	21,0±2,1 ^{ab}	3,46±0,02 ^{ab}	43,65±0,07 ^d	26,6±2,1 ^f	582,8±0,1 ^b
Desmayo	4,1±1,3 ^c	33,1±0,8 ^e	3,5±0,2 ^{ab}	44,32±0,07 ^e	15,0±0,5 ^c	629,7±4,6 ^{de}
Duro Amarelo	5,2±0,1 ^{cd}	31,2±4,7 ^{de}	3,6±0,3 ^{ab}	42,85±0,07 ^d	17,2±4,9 ^{cd}	578,9±0,5 ^b
Zé Dias Miúdo	3,3±0,0 ^b	27,7±1,0 ^{cd}	3,6±0,9 ^{ab}	40,97±0,07 ^c	24,40±0,08 ^{ef}	629,9±3,8 ^{de}
Molar de Alcaria	10,0±2,5 ^e	24,4±1,0 ^{bc}	3,5±0,5 ^{ab}	45,91±0,07 ^f	16,2±3,0 ^c	606,3±8,3 ^c
Bonita do Calço	5,3±0,0 ^{cd}	31,5±1,7 ^{de}	3,13±0,07 ^a	56,11±0,07 ^{kl}	3,9±1,6 ^a	651,1±0,3 ^{ef}
Duro Italiano	2,3±0,0 ^{ab}	30,3±1,3 ^{de}	3,46±0,07 ^{ab}	46,20±0,07 ^f	17,7±1,3 ^{cd}	621,8±0,3 ^d
Patarata	3,4±0,3 ^b	29,9±5,3 ^{de}	3,71±0,09 ^b	38,51±0,07 ^b	24,4±4,8 ^{ef}	605,4±1,6 ^c
Convento	3,72±0,02 ^c	17,3±0,2 ^a	3,8±0,4 ^b	36,47±0,07 ^a	38,8±0,6 ^g	570,6±1,7 ^b
Ferralise	3,5±0,4 ^b	24,1±0,3 ^{bc}	3,3±0,1 ^{ab}	51,76±0,07 ⁱ	17,4±0,8 ^{cd}	633,0±2,1 ^{de}
Masbovera	4,8±1,7 ^{cd}	29,2±0,5 ^{de}	3,62±0,04 ^{ab}	41,32±0,07 ^c	21,0±1,1 ^{de}	611,2±6,8 ^c
Francoli	4,2±1,4 ^c	26,0±2,5 ^c	3,6±0,4 ^{ab}	42,83±0,07 ^d	23,4±1,5 ^e	603,8±4,0 ^c
Lauranne	2,0±1,0 ^a	24,9±2,5 ^c	3,5±0,1 ^{ab}	43,94±0,07 ^{de}	25,7±1,6 ^f	589,5±3,7 ^{bc}
Duro da Estrada	2,9±0,0 ^b	26,8±0,0 ^c	3,5±0,4 ^{ab}	45,03±0,07 ^{ef}	21,8±0,3 ^{de}	483,4±3,3 ^a
Bonita de S. Brás	1,7±0,0 ^a	23,8±1,5 ^{bc}	3,3±0,3 ^{ab}	45,05±0,07 ^{ef}	26,1±1,7 ^f	605,0±1,3 ^c
Ferragnés	3,7±1,1 ^c	29,1±2,1 ^d	3,6±0,2 ^b	44,1±1,8 ^e	19,5±3,6 ^d	570,1±34,9 ^b
Ferraduel	0,3±0,2 ^a	22,2±1,7 ^b	3,55±0,01 ^{ab}	43,45±0,07 ^d	30,5±1,4 ^f	628,6±0,7 ^{de}

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas entre amostras para $p>0,05$

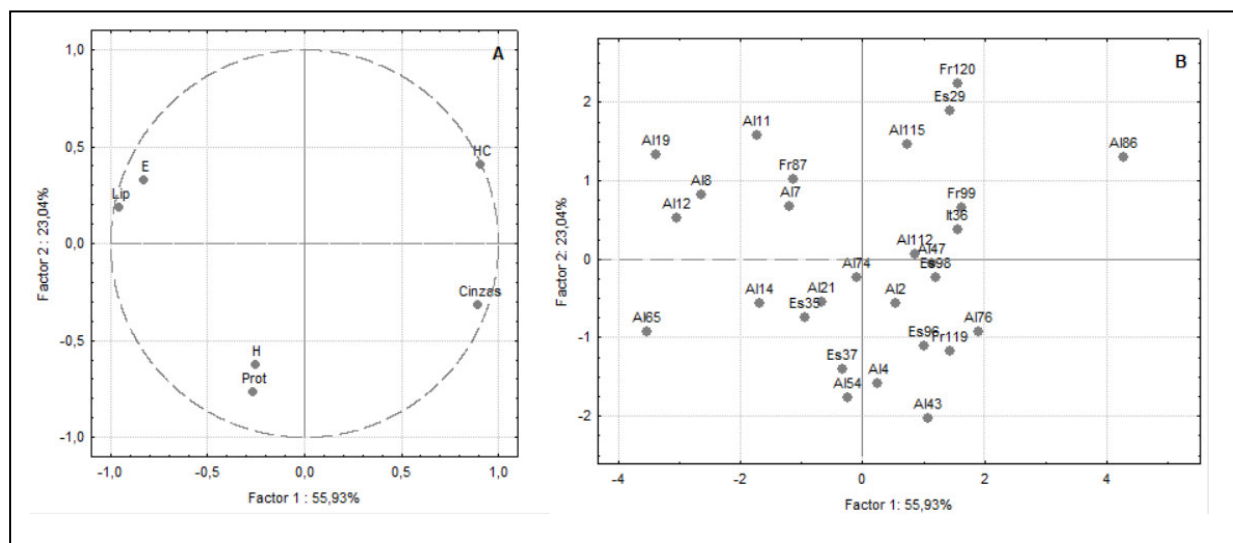


Figura 5 – Análise em componentes principais da humidade, proteína, cinzas, óleo, hidratos de carbono e energia, com a sua interpretação considerando as cultivares estudadas.

3.1.2. Análise Mineral

Os resultados da análise mineral encontram-se representados na Tabela 4. Os elementos estudados foram cálcio, fósforo, potássio, magnésio, sódio, cobalto, cobre, ferro, manganês e zinco (Tabela 4).

O potássio (K) e o fósforo (P) foram os elementos com teores mais elevados nas amostras (Tabela 4). Resultados que estão de acordo com o observado para esta espécie, nos trabalhos de alguns autores (Barreca et al. 2020; Özcan et al. 2011), a concentração de potássio variou entre $307,48 \pm 0,95$ mg/100 g de peso seco (p.s.) e $688,85 \pm 41,89$ mg/100 g de p.s., respetivamente para as cultivares Desmayo e Masbovera. A seguir ao potássio, o fósforo foi o macrolelemento mais representativo no miolo das amêndoas. Os valores registados variaram entre $260,56 \pm 3,17$ mg/100 g de p.s. e $946,93 \pm 49,95$ mg/100 g de p.s., nas cultivares Bonita e Ferraduel respetivamente (Tabela 4). O cálcio e o magnésio também foram detetados nas amostras em concentrações relativamente elevadas. Para o cálcio, os valores variaram entre $72,10 \pm 5,53$ mg/100 g e $265,00 \pm 11,14$ mg/100 g de p.s, nas cultivares Bonita e Ferraduel, respetivamente. Os teores de magnésio variaram entre $66,34 \pm 23,58$ mg/100 g de p.s. para a cultivar Molar Sales e $273,82 \pm 22,09$ mg/100 g de p.s. para a cultivar Masbovera. No caso do cálcio, as cultivares Lourencinha e Cristomorto também

apresentaram valores relativamente elevados e semelhantes aos observados para a cultivar Ferraduel e para o magnésio, destacam-se as seguintes cultivares: Masbovera, Cristomorto, Ferralise e Ferraduel. Para o teor de sódio em amêndoas, os valores encontrados variaram entre $4,03 \pm 0,57$ mg/100 g de p.s. e $10,72 \pm 0,24$ mg/100 g de p.s., encontrados nas cultivares Laurencinha e Laurencinha de Messines, respetivamente. Para além desta cultivar destacam-se também com os maiores valores registados de sódio, as cultivares Boa Casta, Francoli e Ferralise (Tabela 4). Para os macroelementos, os dados encontrados são similares aos encontrados noutras cultivares de amêndoa (Ferragnés, Masbovera, Lauranne, Cristomorto e Guara) em trabalhos de outros autores (Barreca et al. 2020; Özcan et al. 2011).

Nos microelementos, o ferro encontra-se presente nas amostras em concentrações variando entre $3,61 \pm 0,02$ mg/100 g de p.s. na cultivar Marcona e $7,02 \pm 0,81$ mg/100 g de p.s. na cultivar Ferraduel. Outras cultivares também apresentaram concentrações próximas desta: Cancela/Manta Rota, a Lourencinha de Messines e Boa Casta (Tabela 4). Para o zinco, os valores variaram entre $1,99 \pm 0,01$ mg/100 g de p.s. e $5,90 \pm 1,72$ mg/100 g de p.s., nas cultivares Cristomorto e Cacula/Manta Rota. Outras cultivares destacaram-se também quanto ao teor de zinco: Coco, Galamba e Boa Casta. Para o manganês, os teores variaram entre $0,81 \pm 0,14$ mg/100 g de p.s. e $2,00 \pm 0,12$ mg/100 g de p.s. nas cultivares Convento e Galamba. Para o cobre, registaram-se os valores $1,071 \pm 0,003$ mg/100 g de p.s., como o mínimo, e $1,59 \pm 0,03$ mg/100 g de p.s. como o máximo; obtidos nas cultivares Desmayo e Bonita de S. Brás respetivamente. Destacam-se as cultivares Ferragnés e Masbovera para além da Bonita de S. Brás (Tabela 4). Quanto ao cobalto, não foi possível a sua determinação pois em todas as amostras os valores encontrados foram abaixo do limite de deteção de 0,00452 mg/100 g de p.s.

Na Figura 6 encontra-se representada os resultados da análise em componentes principais relativa à análise de minerais de cada cultivar estudada. Na Figura 6 (A) verifica-se que o teor de sódio não contribui para discriminar as diferentes amostras sendo por isso projectado como variável suplementar) sendo o Ca, Mg, P e K os que mais contribuem para a discriminação das amostras ao longo do factor 1 que explica 46% da variabilidade total. A amostra Es37 (Desmayo) correlaciona-se negativamente com os minerais anteriormente referidos. O factor 2 que explica 17% da variabilidade total discrimina as amostras sobretudo pelo seu conteúdo em Zn e Fe. Na Figura 6 (B) pode observar-se a separação das diferentes amostras no mesmo sistema de eixos, sendo as amostras que se posicionam no quadrante 1 as que apresentam mais teor de Ca, Mg, P e K e a amostra Al14 (Molar Sales) a que apresenta maior teor de Zn.

Tabela 4 - Análise mineral das cultivares estudadas (valores apresentados como média n=2 e respectivos desvios padrão, e a análise estatística Fisher LSD $\alpha=0,05$).

Cultivar	Ca (mg/100 g de p.s.)	Co (mg/100 g de p.s.)	Cu (mg/100 g de p.s.)	Fe (mg/100 g de p.s.)	P (mg/100 g de p.s.)	K (mg/100 g de p.s.)	Mn (mg/100 g de p.s.)	Mg (mg/100 g de p.s.)	Na (mg/100 g de p.s.)	Zn (mg/100 g de p.s.)
Coco	124,51±19,50 ^{ab}	≤0,00452	1,37±0,02 ^{ab}	5,45±0,34 ^{ab}	393,89±67,10 ^b	632,40±111,08 ^b	1,62±0,04 ^{bc}	203,57±32,01 ^{cd}	5,55±0,38 ^{ab}	3,09±0,08 ^a
Cacela/Manta Rota	139,17±21,39 ^{ab}	≤0,00452	1,24±0,06 ^{ab}	6,29±1,01 ^b	389,84±47,03 ^b	596,68±59,58 ^b	1,59±0,04 ^{bc}	196,59±24,35 ^{cd}	4,72±0,18 ^a	5,90±1,72 ^b
Boa Casta	150,13±29,33 ^b	≤0,00452	1,22±0,07 ^{ab}	5,87±0,51 ^{ab}	399,67±55,54 ^b	591,50±69,32 ^b	1,46±0,05 ^b	228,10±31,92 ^{cd}	7,90±1,01 ^b	2,82±0,05 ^a
Bonita	72,10±5,53 ^a	≤0,00452	1,23±0,02 ^{ab}	5,71±0,53 ^{ab}	260,56±3,17 ^a	406,59±9,44 ^a	1,36±0,02 ^b	140,50±4,85 ^{ab}	4,92±0,32 ^a	2,46±0,06 ^a
Galamba	131,84±33,04 ^{ab}	≤0,00452	1,39±0,04 ^{ab}	5,60±0,11 ^{ab}	296,82±13,00 ^a	493,46±25,24 ^{ab}	2,00±0,12 ^c	158,00±0,51 ^b	6,66±0,13 ^{ab}	2,97±0,03 ^a
Zé de Oliveira	208,00±2,29 ^c	≤0,00452	1,32±0,01 ^{ab}	5,34±0,11 ^{ab}	434,24±5,21 ^b	571,07±0,27 ^b	1,722±0,002 ^c	228,32±0,63 ^{cd}	4,51±0,06 ^a	3,10±0,07 ^a
Molar Sales	119,96±15,65 ^{ab}	≤0,00452	1,084±0,005 ^a	4,97±0,10 ^{ab}	290,46±34,08 ^a	413,15±49,08 ^a	1,43±0,06 ^b	66,34±23,58 ^a	4,63±1,05 ^a	2,62±0,30 ^a
Lourencinha	246,50±3,52 ^c	≤0,00452	1,05±0,02 ^a	4,08±0,06 ^a	362,79±5,17 ^b	558,41±7,96 ^b	1,41±0,02 ^b	201,08±2,87 ^{cd}	4,03±0,57 ^a	2,20±0,03 ^a
Lourencinha de Messines	125,58±10,30 ^{ab}	≤0,00452	1,02±0,13 ^a	5,90±1,08 ^{ab}	364,26±27,95 ^b	495,54±2,98 ^{ab}	1,18±0,25 ^{ab}	173,50±4,74 ^{bc}	10,72±0,24 ^c	2,87±0,58 ^a
Guara	172,00±14,72 ^b	≤0,00452	1,19±0,7 ^{ab}	5,04±0,09 ^{ab}	396,31±7,88 ^b	630,08±9,48 ^b	1,70±0,09 ^c	228,27±13,11 ^{cd}	7,15±0,26 ^b	2,37±0,10 ^a
Marcona	191,12±3,49 ^c	≤0,00452	1,127±0,004 ^{ab}	3,61±0,02 ^a	426,41±16,09 ^b	605,40±8,18 ^b	1,81±0,03 ^c	231,33±6,71 ^{cd}	4,24±0,01 ^a	2,34±0,01 ^a
Cristomorto	234,08±10,09 ^c	≤0,00452	1,120±0,002 ^{ab}	5,47±0,54 ^{ab}	445,46±18,76 ^b	626,37±23,25 ^b	1,69±0,01 ^c	267,70±8,17 ^d	5,43±0,55 ^{ab}	3,00±0,35 ^a
Desmayo	58,60±0,18 ^a	≤0,00452	1,071±0,003 ^a	3,77±0,01 ^a	180,20±0,55 ^a	307,48±0,95 ^a	0,945±0,003 ^a	89,47±0,28 ^{ab}	4,15±1,05 ^a	1,99±0,01 ^a
Duro Amarelo	94,02±0,91 ^{ab}	≤0,00452	1,17±0,06 ^{ab}	4,87±0,37 ^{ab}	329,00±2,09 ^b	492,87±13,67 ^{ab}	1,58±0,09 ^{bc}	167,57±2,61 ^b	6,13±0,57 ^{ab}	2,27±0,25 ^a
Zé Dias Miúdo	138,27±40,91 ^{ab}	≤0,00452	1,28±0,04 ^{ab}	4,54±0,29 ^a	378,33±62,36 ^b	546,60±67,03 ^b	1,727±0,003 ^c	204,28±27,45 ^{cd}	6,08±0,24 ^{ab}	2,48±0,07 ^a
Molar de Alcaria	112,28±3,93 ^{ab}	≤0,00452	1,25±0,05 ^{ab}	4,13±0,01 ^a	379,94±2,01 ^b	562,50±24,37 ^b	1,42±0,20 ^b	207,80±3,66 ^{cd}	6,21±0,73 ^{ab}	2,36±0,06 ^a
Bonita do Calicho	79,26±1,45 ^a	≤0,00452	1,19±0,01 ^{ab}	5,31±0,06 ^{ab}	348,13±6,00 ^{ab}	490,53±3,31 ^{ab}	1,51±0,13 ^{bc}	182,89±1,40 ^c	5,44±0,47 ^{ab}	2,14±0,13 ^a
Duro Italiano	114,47±2,80 ^{ab}	≤0,00452	1,203±0,001 ^{ab}	5,10±0,18 ^{ab}	398,15±5,33 ^b	580,26±6,63 ^b	1,54±0,07 ^{bc}	216,01±8,06 ^{cd}	5,96±0,51 ^{ab}	2,72±0,08 ^a
Patarata	145,79±5,17 ^{ab}	≤0,00452	1,27±0,03 ^{ab}	5,32±0,19 ^{ab}	383,56±5,51 ^b	533,82±0,58 ^b	1,400±0,001 ^b	200,97±5,20 ^{cd}	4,52±0,07 ^a	2,68±0,04 ^a
Convento	120,38±16,84 ^{ab}	≤0,00452	1,11±0,17 ^a	4,54±0,47 ^{ab}	369,59±34,93 ^b	527,48±39,50 ^b	0,81±0,14 ^a	181,71±15,36 ^c	6,10±0,93 ^{ab}	1,50±0,23 ^a
Ferralise	196,12±6,41 ^c	≤0,00452	1,03±0,01 ^a	4,88±0,42 ^{ab}	516,46±36,35 ^b	653,55±21,58 ^b	1,410±0,002 ^b	254,90±15,43 ^{cd}	7,17±0,75 ^b	2,13±0,03 ^a
Masbovera	180,86±8,76 ^{bc}	≤0,00452	1,55±0,05 ^b	5,02±0,13 ^{ab}	531,55±52,46 ^b	688,85±41,89 ^b	1,34±0,01 ^b	273,82±22,09 ^d	4,05±0,22 ^a	2,93±0,19 ^a
Francoli	180,70±5,32 ^{bc}	≤0,00452	1,33±0,07 ^{ab}	5,54±0,61 ^{ab}	331,29±4,41 ^a	525,78±8,81 ^b	1,34±0,03 ^b	192,69±8,82 ^{cd}	7,48±0,87 ^b	2,52±0,06 ^a
Lauranne	158,94±0,52 ^b	≤0,00452	1,19±0,02 ^{ab}	4,66±0,23 ^{ab}	297,27±6,41 ^a	468,11±3,50 ^a	1,75±0,02 ^c	150,09±0,47 ^{ab}	4,87±0,03 ^a	2,47±0,06 ^a
Duro da Estrada	94,13±14,40 ^{ab}	≤0,00452	1,26±0,10 ^{ab}	4,09±0,06 ^a	272,55±25,84 ^a	428,81±24,04 ^a	1,54±0,01 ^{bc}	174,28±14,52 ^{bc}	5,07±0,39 ^a	2,47±0,22 ^a
Bonita de S.Brás	137,45±3,35 ^{ab}	≤0,00452	1,59±0,03 ^b	5,11±0,01 ^{ab}	369,21±27,92 ^b	519,13±23,71 ^b	1,09±0,03 ^a	196,65±19,16 ^{cd}	4,04±0,19 ^a	2,56±0,00 ^a
Ferragnés	168,8±54,4 ^b	≤0,00452	1,5±0,6 ^b	5,3±0,8 ^{ab}	436,6±82,4 ^b	548,0±97,6 ^b	1,9±0,3 ^c	219,6±42,1 ^{cd}	6,20±1,0 ^{ab}	2,6±0,4 ^a
Ferraduel	265,00±11,14 ^c	≤0,00452	1,204±0,002 ^{ab}	7,02±0,81 ^b	946,93±49,95 ^c	683,80±12,13 ^b	1,681±0,004 ^c	246,25±0,51 ^{cd}	5,48±0,21 ^{ab}	2,66±0,07 ^a

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas entre amostras para $p>0,05$; p.s.=peso seco

de K232 e K270 tiveram valores mínimos de $96,0 \pm 0,10$ na cultivar Bonita e $8,2 \pm 0,10$ na cultivar Molar Sales; já os valores máximos foram $167,0 \pm 0,10$ na cultivar Galamba e $19,8 \pm 0,10$ na cultivar Galamba. Estes valores estão dentro do intervalo reportado por alguns autores (Sakar et al. 2021). De acordo com a Farmacopeia Portuguesa os óleos de amêndoa virgem não devem apresentar valores de K232/K270 inferiores a 7. De acordo com os valores apresentados na Tabela 5, verifica-se que todas as amostras cumprem este requisito. O valor mais baixo obtido foi de $7,03 \pm 0,04$ na cultivar Coco e o valor mais alto foi de $12,9 \pm 0,2$ na cultivar Molar Sales.

Tabela 5 - Determinação do estado oxidativo do óleo virgem obtido (valores apresentados como média $n=2$ e respetivos desvios padrão, e a análise estatística Fisher LSD $\alpha=0,005$).

Cultivar	IA (mg KOH/g)	IP (meq O ₂ /kg)	K ₂₃₂	K ₂₇₀	K ₂₃₂ /K ₂₇₀
Coco	5,2±0,9 ^c	7,2±1,5 ^c	113,9±0,10 ^d	16,2±0,10 ^f	7,03±0,04 ^a
Cacela/Manta Rota	6,0±1,6 ^d	7,0±0,8 ^c	109,3±0,10 ^c	12,9±0,10 ⁿ	8,49±0,06 ^d
Boa Casta	24,4±1,5 ^f	6,47±0,03 ^c	112,0±0,10 ^{cd}	11,9±0,10 ^l	9,41±0,07 ^h
Bonita	5,2±2,0 ^c	6,6±0,2 ^c	96,0±0,10 ^a	9,2±0,10 ^c	10,4±0,1 ^k
Galamba	6,7±1,2 ^d	11,6±1,8 ^f	167,0±0,10 ^h	19,8±0,10 ^s	8,43±0,04 ^d
Zé de Oliveira	3,7±0,6 ^b	8,4±1,0 ^{cd}	129,9±0,10 ^g	15,0±0,10 ^q	8,69±0,05 ^e
Molar Sales	6,2±0,00 ^d	11,6±4,3 ^f	105,2±0,10 ^b	8,2±0,10 ^a	12,9±0,2 ^p
Lourencinha	3,3±0,2 ^{ab}	8,7±0,2 ^d	115,8±0,10 ^{de}	16,0±0,10 ^r	7,24±0,04 ^b
Lourencinha de Messines	4,8±0,8 ^c	10,2±0,6 ^{def}	104,1±0,10 ^b	11,3±0,10 ^{ij}	9,21±0,07 ^g
Guara	3,5±0,3 ^{ab}	7,0±0,8 ^c	111,3±0,10 ^{cd}	15,6±0,10 ^f	7,14±0,04 ^{ab}
Marcona	2,4±0,5 ^a	8,4±2,3 ^{cd}	103,5±0,10 ^b	14,2±0,10 ^p	7,29±0,04 ^b
Cristomorto	4,7±0,3 ^c	6,1±1,5 ^{bc}	110,7±0,10 ^c	10,0±0,10 ^d	11,1±0,1 ^m
Desmayo	4,8±0,8 ^c	8,24±0,09 ^{cd}	124,3±0,10 ^f	14,0±0,10 ^p	8,91±0,06 ^f
Duro Amarelo	10,4±0,1 ^e	8,1±0,4 ^{cd}	112,7±0,10 ^d	14,3±0,10 ^p	7,86±0,05 ^c
Zé Dias Miúdo	3,4±0,3 ^{ab}	4,2±1,2 ^b	109,9±0,10 ^c	8,2±0,10 ^a	13,4±0,2 ^q
Molar de Alcaria	4,1±0,1 ^{bc}	9,4±0,5 ^{de}	118,6±0,10 ^e	12,2±0,10 ^m	9,8±0,07 ⁱ
Bonita do Calicho	5,0±1,3 ^c	2,68±0,01 ^a	106,6±0,10 ^b	14,9±0,10 ^q	7,15±0,04 ^{ab}
Duro Italiano	2,5±0,00 ^a	5,5±0,8 ^b	118,2±0,10 ^e	11,6±0,10 ^{kl}	10,25±0,08 ^j
Patarata	4,5±0,6 ^c	6,3±1,5 ^c	132,1±0,10 ^g	10,5±0,10 ^{ef}	12,6±0,1 ^o
Convento	3,1±0,8 ^a	9,2±1,67 ^{de}	114,7±0,10 ^{de}	13,5±0,10 ^o	8,53±0,06 ^d
Ferralise	3,86±0,01 ^b	6,3±1,3 ^c	117,2±0,10 ^e	10,9±0,10 ^{gh}	10,78±0,09 ^l
Masbovera	4,6±0,9 ^c	10,8±0,3 ^{ef}	118,4±0,10 ^e	10,1±0,10 ^{de}	11,7±0,1 ⁿ
Francoli	4,2±0,4 ^{bc}	6,3±0,9 ^c	110,1±0,10 ^c	10,0±0,10 ^d	11,0±0,1 ^m
Lauranne	4,0±0,3 ^{bc}	10,6±0,5 ^{def}	114,1±0,10 ^d	12,4±0,10 ^m	9,18±0,07 ^g
Duro da Estrada	3,1±0,1 ^a	4,2±0,6 ^b	105,4±0,10 ^b	11,8±0,10 ^l	8,91±0,07 ^f
Bonita de S. Brás	2,8±0,2 ^a	5,5±0,00 ^b	109,5±0,10 ^c	10,1±0,10 ^d	10,9±0,1 ^l
Ferragnés	2,45±0,26 ^a	5,65±0,88 ^b	115,05±6,55 ^{de}	15,96±0,85 ^r	7,21±0,04 ^b
Ferraduel	3,53±0,07 ^{ab}	8,1±0,7 ^{cd}	103,3±0,10 ^b	8,7±0,10 ^b	11,8±0,1 ⁿ

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas entre amostras para $p>0.05$

Na Tabela 6, estão representados os valores de MUFAs, PUFAs e SFAs nos óleos das amêndoas. Os valores que foram obtidos para os ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) variaram entre $66,226 \pm 0,009$ % na cultivar Desmayo e $82,55 \pm 0,02$ % na cultivar Bonita de S. Brás. Algumas cultivares que se destacam são, Francoli, Masbovera e Ferraduel com

valores muito próximos ao valor máximo encontrado por alguns autores (Sakar et al. 2021). Em relação aos ácidos gordos polinsaturados (PUFA), os valores obtidos não são tão elevados como os MUFA, tendo-se registado como valor mínimo $10,39 \pm 0,02$ % na cultivar Bonita de S. Brás e como valor máximo $24,455 \pm 0,007$ % na cultivar Desmayo. Para além da cultivar Desmayo as cultivares Coco, Patarata e Zé Dias Miúdo apresentam valores interessantes de PUFAs. Por fim, os ácidos gordos saturados (SFA) que tiveram valores mínimos de $7,02 \pm 0,01$ % na cultivar Bonita de S. Brás e valores máximos de $9,562 \pm 0,004$ % na cultivar Coco. Outras cultivares que também obtiveram valores elevados foram Desmayo, Bonita e Duro Italiano e similares com os descritos por Barreira et al. (2012).

Na Figura 7 encontram-se representados os resultados da análise em componentes principais relativamente ao IA, IP, K232, K270, K232/K270 e a sua composição de cada óleo obtido das cultivares em estudo. Na Figura 7 (A) verifica-se que o IA é o que menos contribui para discriminar as diferentes amostras (pelo que foi projetado com variável suplementar) sendo o K270 e o K232 os que mais contribuem para a discriminação das amostras ao longo do fator 1 que explica 53% da variabilidade total. As amostras Al47 (Zé Dias Miúdo), Fr120 (Ferragnés), Al8 (Bonita), Al115 (Bonita de S. Brás) e Es98 (Francoli) correlacionam-se negativamente com os parâmetros anteriormente referidos. A amostra Al11 (Galamba) é muito diferente das outras pois apresenta os valores mais elevados de K232 e K270. O fator 2 que explica 30% da variabilidade total discrimina as amostras sobretudo pelo índice IP.

Na Figura 7 (C) verifica-se que o teor de MUFA está inversamente correlacionado com o teor de PUFA e SFA sendo que esta diferença explica 78% da variabilidade total observada. O factor 2 que explica 22% da variabilidade total discrimina as amostras sobretudo pelo seu conteúdo em SFA. Na Figura 7 (D) pode observar-se a separação das diferentes amostras no mesmo sistema de eixos, podendo ser identificadas as amostras com mais MUFA, PUFA e SFA em relação ao seu posicionamento relativo e comparativamente com a Figura 7 (C).

Tabela 6 - Composição oleica das cultivares estudadas (valores apresentados como média n=2 e respectivos desvios padrão, e a análise estatística Fisher LSD $\alpha=0,005$).

Cultivar	MUFA (%)	PUFA (%)	SFA (%)
Coco	67,979±0,005 ^b	22,410±0,005 ^j	9,562±0,004 ^h
Cacela/Manta Rota	75,38±0,04 ^e	15,987±0,003 ^f	8,79±0,11 ^{fg}
Boa Casta	74,61±0,02 ^e	16,984±0,002 ^f	8,44±0,03 ^{ef}
Bonita	77,66±0,01 ^g	13,166±0,001 ^c	9,091±0,002 ^{gh}
Galamba	72,483±0,004 ^{cd}	19,67±0,01 ^h	7,839±0,003 ^{cd}
Zé de Oliveira	77,33±0,00 ^g	14,90±0,00 ^{de}	7,78±0,00 ^c
Molar Sales	73,535±0,003 ^{de}	18,387±0,002 ^g	8,001±0,003 ^d
Lourencinha	79,18±0,01 ^h	12,678±0,003 ^c	8,135±0,009 ^{de}
Lourencinha de Messines	76,87±0,04 ^{fg}	14,36±0,01 ^d	8,803±0,007 ^g
Guara	75,328±0,005 ^e	16,158±0,002 ^f	8,504±0,003 ^f
Marcona	77,30±0,02 ^g	14,487±0,009 ^d	8,208±0,003 ^e
Cristomorto	77,65±0,01 ^g	14,4754±0,0002 ^d	7,76±0,01 ^c
Desmayo	66,226±0,009 ^a	24,455±0,007 ^h	9,2411±0,0009 ^h
Duro Amarelo	75,48±0,06 ^e	15,71±0,03 ^e	8,716±0,002 ^{fg}
Zé Dias Miúdo	71,69±0,03 ^c	20,715±0,008 ⁱ	7,6396±0,0006 ^{bc}
Molar de Alcaria	74,684±0,008 ^e	16,598±0,002 ^f	8,708±0,009 ^{fg}
Bonita do Calço	76,224±0,005 ^f	15,0975±0,0007 ^{de}	8,675±0,006 ^f
Duro Italiano	79,108±0,006 ^h	11,830±0,002 ^b	8,972±0,004 ^{gh}
Patarata	68,906±0,008 ^b	22,90±0,02 ^j	8,18±0,01 ^{de}
Convento	73,00±0,02 ^d	18,20±0,01 ^g	8,797±0,006 ^g
Ferralise	80,57±0,03 ⁱ	11,947±0,001 ^{bc}	7,431±0,003 ^b
Masbovera	81,616±0,002 ^{ij}	11,1207±0,006 ^{ab}	7,233±0,003 ^a
Francoli	81,64±0,03 ^{ij}	10,455±0,03 ^a	7,880±0,004 ^{cd}
Lauranne	76,054±0,005 ^f	16,172±0,002 ^f	7,746±0,009 ^c
Duro da Estrada	72,92±0,02 ^d	19,41±0,02 ^h	7,75±0,10 ^c
Bonita de S. Brás	82,55±0,02 ^j	10,39±0,02 ^a	7,02±0,01 ^a
Ferragnés	78,85±1,84 ^h	13,07±1,30 ^c	8,03±0,52 ^d
Ferraduel	81,01±0,01 ⁱ	11,66±0,01 ^b	7,328±0,002 ^{ab}

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas entre amostras para $p>0,05$

3.3. Solução Hidroalcoólica

3.3.1. Atividades Antioxidantes, Anti-Inflamatórias e Enzimáticas

Nos extratos hidroalcoólicos obtidos a partir do miolo de todas as cultivares avaliaram-se quatro parâmetros: o teor fenólico total, a atividade antioxidante, anti-inflamatória, a atividade enzimática, o poder redutor e a atividade antimicrobiana.

Os testes realizados para determinar essas atividades foram determinação de conteúdo total de fenóis (TPC, do inglês total phenol content), capacidade de sequestração do radical livre DPPH (DPPH), capacidade de sequestração do radical superóxido (Sp) e capacidade de sequestração do monóxido de azoto (NO). A inibição da atividade da enzima tirosinase (TY) pelos extratos foi igualmente avaliada, dado que a avaliação desta inibição se torna cada vez mais necessária para a validação dos produtos na área medicinal (Mukherjee et al. 2018).

Em relação ao radical Sp a sua formação é essencial para a função celular normal; eles constituem um sistema de segundo mensageiro absolutamente necessário para a regulação do metaboloma, contudo numa situação de desregulação por uma produção exacerbada e/ou uma eliminação pouco eficaz dos radicais livres pode conduzir a uma acumulação de superóxido radical anião e/ou outras espécies reativas de oxigênio. Nestas circunstâncias, estes radicais reagem com as biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos e lípidos) danificando as estruturas celulares e, conseqüentemente, são responsáveis por algumas doenças. Nestas circunstâncias em que o sistema antioxidante endógeno não está capaz de eliminar o excesso de radicais livres, é necessária a ação de antioxidantes exógenos. (Linnane et al. 2007). O monóxido de azoto (NO) é bem reconhecido como um sinalizador inter- e intracelular moléculas que regula a dilatação dos vasos sanguíneos, atuando como um neurotransmissor (medeia a ativação e inibição de cascatas inflamatórias) e regulação celular metabólica, bem como um número crescente de outros sistemas fisiológicos. Mesmo que o NO fisiológico seja necessário para a defesa contra vários patógenos, o NO excessivo pode desencadear a sinalização inflamatória e a morte celular pelo que a necessidade de encontrar compostos que possam atuar como captadores destes radicais livres (Subedi et al. 2021)

A enzima TY (monofenol ou o-difenol oxidoreductase), também conhecida como polifenol oxidase (PPO), é uma monooxigenase contendo cobre. Esta enzima é a chave na biossíntese da melanina, que envolve a formação da cor do cabelo e da pele dos mamíferos e evita que a pele seja danificada pela radiação ultravioleta (El-Guendouz et al. 2016). O excesso de melanina causa vários distúrbios dermatológicos (melasma e manchas senis). A tirosinase também é responsável por reações de escurecimento enzimático em frutas e vegetais danificados. O estudo da inibição da tirosinase é um campo ativo de pesquisa na área dermatológica, ciência biomédica, alimentar e agrícola (Mukherjee et al. 2018).

O conteúdo total de fenóis é um parâmetro muito importante, pois, afeta todos os outros testes, ou seja, uma amostra que tenha um valor elevado de fenóis poderá refletir uma maior bioatividade (Prgomet et al. 2019). O valor mínimo obtido de TPC foi $0,7 \pm 0,1$ mg GAE/100 g pertencente à cultivar Masbovera e o valor máximo de $5,9 \pm 0,5$ mg GAE/100 g apresentado pela cultivar Francoli. Estes valores são superiores aos obtidos nos trabalhos realizados por (Oliveira et al. 2019; Roncero et al. 2020). Para além da cultivar Francoli destacam-se pelo seu conteúdo em fenóis as cultivar Patarata ($5,1 \pm 0,4$ mg GAE/100 g) e Zé Dias Miúdo ($4,5 \pm 0,7$ mg GAE/100 g).

A capacidade de sequestração do radical livre DPPH foi analisada e apresentada como a concentração mínima necessária da amostra para sequestrar 50% do radical DPPH (IC₅₀, do inglês inhibitory concentration 50%). O valor mínimo registado neste estudo foi $1,05 \pm 0,03$ mg/mL na cultivar Francoli e o valor máximo $7,48 \pm 0,09$ mg/mL na Zé de Oliveira. Valores que estão de acordo com o já registado por outros autores (Barreira et al. 2008; Oliveira et al. 2019). Como os valores são apresentados em IC₅₀, significa que quanto menor a concentração maior a atividade, ou seja, para atingir uma inibição de 50% é necessária uma concentração de $1,05$ mg/mL no caso da cultivar Francoli. Outras cultivares que também apresentam um valor baixo e, portanto, melhor atividade antioxidante foram Patarata ($1,06 \pm 0,02$ mg/mL), Ferraduel ($1,62 \pm 0,01$ mg/mL) e Lauranne ($1,62 \pm 0,08$ mg/mL).

A capacidade de sequestração do radical superóxido (Sp) foi determinada e os valores apresentados em IC₅₀, sendo o valor mais baixo registado neste estudo o da cultivar Patarata ($4,3 \pm 0,2$ mg/mL) e o valor máximo $15,7 \pm 0,5$ mg/mL na Bonita de S. Brás. Outras cultivares que também apresentam um valor baixo e, portanto, melhor atividade foram Ferraduel ($4,4 \pm 0,3$ mg/mL), Francoli ($5,1 \pm 0,1$ mg/mL) e Duro da Estrada ($6,7 \pm 0,4$ mg/mL). Esta capacidade já foi estudada anteriormente por Siriwardhana e Shahidi (2002), embora os resultados obtidos sejam inferiores aos reportados.

Os valores da capacidade de sequestração do monóxido de azoto (NO) foi determinada através da determinação da percentagem de inibição, considerando uma concentração de 30 mg/mL de extrato hidroalcoólico. O valor mínimo registado neste estudo foi $10,0 \pm 3,9$ % na cultivar Boa Casta e o valor máximo $62,6 \pm 3,3$ % na Ferralise. Outras cultivares que também apresentam um valor baixo foram Ferraduel ($57,9 \pm 2,9$ %), Galamba ($55,6 \pm 0,8$ %) e Zé Dias Miúdo ($55,5 \pm 1,0$ %).

A capacidade de inibição da enzima tirosinase foi também determinada a percentagem de inibição considerando uma concentração de 8,33 mg/mL. O valor mínimo de inibição obtido foi $7,1 \pm 0,2$ % na cultivar Duro Italiano em contraste com o valor máximo obtido de $67,5 \pm 2,4$ % encontrado na cultivar Desmayo.

Na Figura 8 encontra-se representada os resultados da análise em componentes principais relativa à análise dos extratos hidroalcoolicos das cultivares em estudo. O factor 1 que explica 45% da variação total está relacionado com a variação do DPPH que é inversamente proporcional com os valores de ON e TPC. Para esta relação podemos verificar que as amostras Al7 (Boa Casta), Al65 (Bonita do Calicho), Al8 (Bonita) e Al19 (Lourencinha) apresentavam valores mais elevados de DPPH (menor capacidade antioxidante) e consequentemente menor valor de TPC e ON, inversamente as amostras Es98 (Francoli), Al76 (Patarata), Fr120 (Ferraduel), Al47 (Zé Dias Miudo), Al11 (Galamba), Al112 (Duro da Estrada), Fr99 (Lauranne) e Fr87 (Francoli) constituem o grupo em que estes parâmetros são mais elevados. O eixo 2 que explica 28% da variação global é explicado pela variação de valores entre superóxido e tirosinase sendo que os valores mais elevados de tirosinase são encontrados para as amostras Es37 (Desmayo), Al12 (Zé de Oliveira), com valores $67,5 \pm 2,4\%$ e $55,1 \pm 1,1\%$ respetivamente, o que demonstra a sua capacidade inibitória para a enzima; e os mais elevados de superóxido para as amostras Al74 (Duro Italiano) ($15,6 \pm 0,6$ mg/mL) e Al115 (Bonita de S.Brás) ($15,7 \pm 0,5$ mg/mL), como estes valores são expressos em IC_{50} significa que quanto maior a concentração menor a atividade.

Tabela 7 - Atividades antioxidante, anti-inflamatória e enzimática (valores apresentados como média n=3 e respetivos desvios padrão, e a análise estatística Fisher LSD $\alpha=0,005$).

Cultivar	TPC (mg GAE/100 g)	DPPH (mg/mL)	Sp (mg/mL)	ON (%)	TY (%)
Coco	2,6±0,1 ^{de}	2,70±0,05 ^e	9,2±0,4 ^f	44,2±1,8 ^{ef}	21,8±0,4 ^{ab}
Cacela/Manta Rota	1,4±0,2 ^b	6,63±0,08 ^m	10,08±0,53 ^g	25,9±0,4 ^e	22,4±0,7 ^{ab}
Boa Casta	1,2±0,1 ^{ab}	8,5±0,1 ^p	-	10,0±3,9 ^a	35,3±1,2 ^b
Bonita	1,06±0,08 ^{ab}	9,35±0,06 ^q	7,9±0,2 ^d	24,0±3,4 ^{bc}	24,0±3,4 ^{ab}
Galamba	3,8±0,4 ^f	1,73±0,05 ^b	7,3±0,2 ^{cd}	55,6±0,8 ^g	35,1±1,1 ^b
Zé de Oliveira	1,3±0,1 ^b	7,48±0,09 ^o	-	25,2±3,6 ^{bc}	55,1±1,1 ^{cd}
Molar Sales	1,2±0,1 ^b	7,16±0,07 ⁿ	10,9±0,5 ^h	24,0±3,6 ^{bc}	47,3±2,1 ^c
Lourencinha	1,0±0,2 ^{ab}	9,4±0,3 ^q	7,29±0,08 ^{cd}	18,1±3,6 ^b	17,0±0,3 ^a
Lourencinha de Messines	3,0±0,2 ^e	2,43±0,03 ^d	12,5±0,8 ⁱ	42,7±2,1 ^e	39,22±0,09 ^{bc}
Guara	2,3±0,2 ^{cd}	3,21±0,05 ^f	7,47±0,09 ^d	43,4±1,8 ^{ef}	25,9±1,7 ^{ab}
Marcona	0,75±0,02 ^a	-	-	13,4±2,4 ^a	24,9±1,0 ^{ab}
Cristomorto	2,4±0,1 ^d	3,46±0,05 ^{gh}	8,9±0,3 ^{ef}	43,3±2,9 ^{ef}	14,1±3,4 ^a
Desmayo	1,5±0,2 ^b	6,2±0,1 ^l	-	37,8±1,7 ^{de}	67,5±2,4 ^d
Duro Amarelo	2,5±0,1 ^{de}	3,56±0,08 ^h	7,1±0,2 ^c	42,8±0,5 ^e	15,3±2,4 ^a
Zé Dias Miúdo	4,5±0,7 ^f	1,63±0,04 ^b	8,3±0,3 ^e	55,5±1,0 ^g	38,7±0,5 ^{bc}
Molar de Alcaria	1,94±0,03 ^c	4,02±0,09 ⁱ	14,3±0,2 ^j	45,5±2,2 ^f	36,2±0,2 ^b
Bonita do Calicho	0,94±0,07 ^{ab}	10,1±0,2 ^r	8,0±0,4 ^d	18,1±3,6 ^b	24,0±0,9 ^{ab}
Duro Italiano	0,91±0,02 ^a	-	15,6±0,6 ^l	31,9±3,7 ^d	7,1±0,2 ^a
Patarata	5,1±0,4 ^g	1,06±0,02 ^a	4,3±0,2 ^a	50,4±8,2 ^f	34,9±1,4 ^b
Convento	1,42±0,04 ^b	5,4±0,1 ^k	15,1±0,4 ^k	40,5±2,2 ^e	66,8±1,0 ^d
Ferralise	3,3±0,3 ^e	1,92±0,06 ^c	7,1±0,3 ^c	62,6±3,3 ^g	22,6±2,3 ^{ab}
Masbovera	0,7±0,1 ^a	-	7,56±0,07 ^d	31,4±2,5 ^{cd}	18,1±0,8 ^{ab}
Francoli	5,9±0,5 ^h	1,05±0,03 ^a	5,1±0,1 ^b	48,4±2,8 ^f	56,8±0,4 ^{cd}
Lauranne	4,2±0,7 ^f	1,62±0,08 ^b	9,2±0,7 ^f	48,5±5,0 ^f	33,3±3,0 ^b
Duro da Estrada	4,1±0,3 ^f	1,65±0,05 ^b	6,7±0,4 ^c	55,2±0,6 ^g	30,0±2,4 ^b
Bonita de S. Brás	0,82±0,03 ^a	-	15,7±0,5 ^l	22,0±1,5 ^{bc}	21,33±0,05 ^{ab}
Ferragnés	2,2±0,3 ^c	4,7±1,5 ^j	7,0±0,1 ^c	26,9±12,2 ^c	55,7±37,8 ^{cd}
Ferraduel	4,0±0,5 ^f	1,62±0,01 ^b	4,4±0,3 ^a	57,9±2,9 ^g	36,1±2,4 ^b

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas entre amostras para $p>0,05$

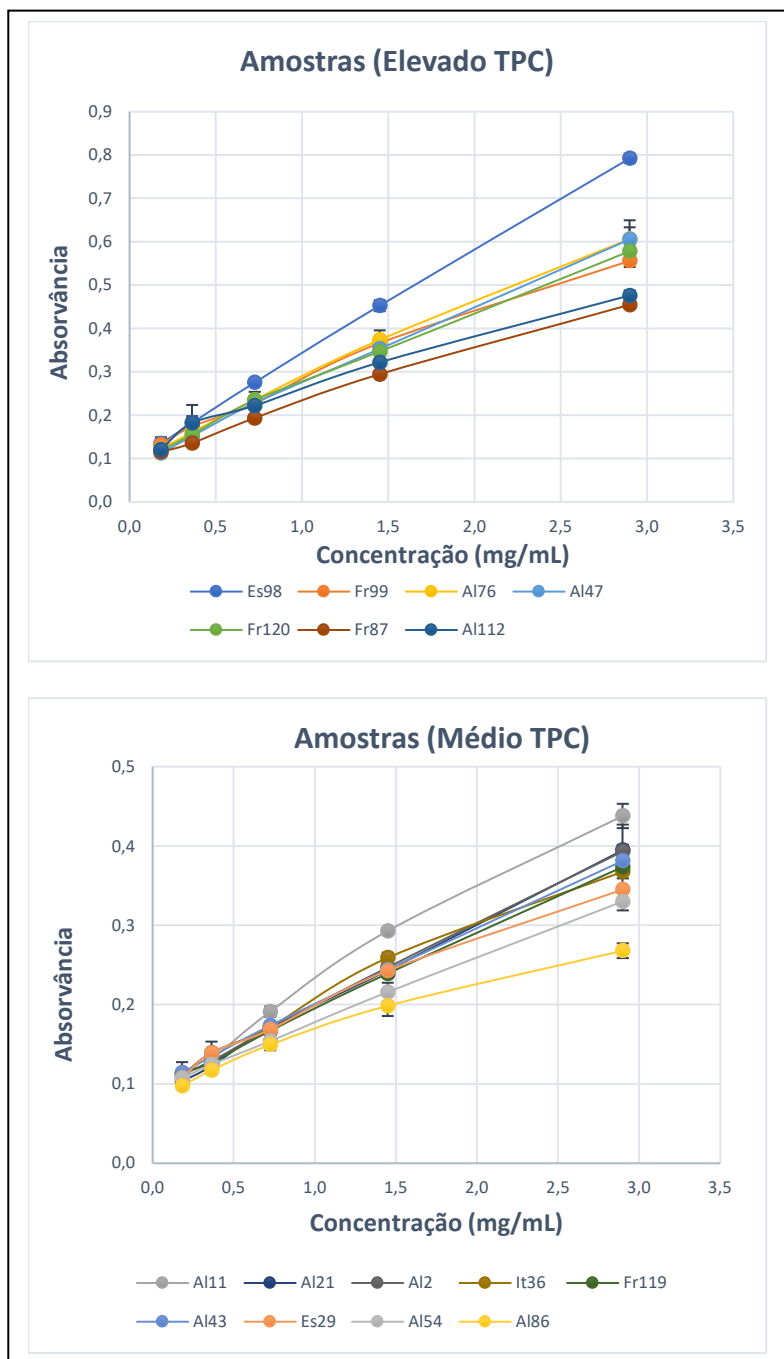


Figura 9 - Resultados referentes ao poder redutor dos diferentes grupos de cultivares estudados.

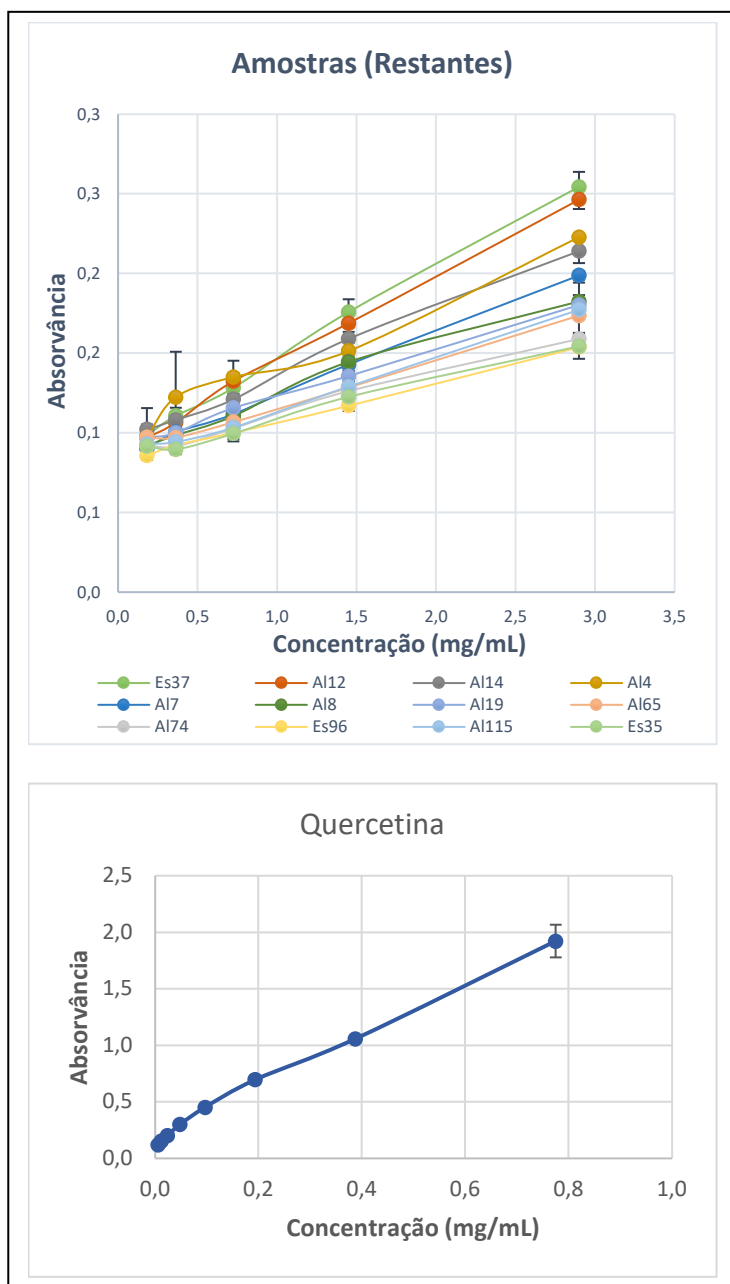


Figura 10 – Continuação dos resultados obtidos referentes ao poder redutor dos diferentes grupos de cultivares estudados.

3.3.3. Atividade Antimicrobiana

Tal como descrito no ponto 2.13.2 a atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos foi avaliada pelo teste de difusão em disco. Na Tabela 8, encontram-se registados os diâmetros dos halos de inibição obtidos para os extratos hidroalcoólicos obtidos para cada cultivar nas diversas estirpes. As espécies bacterianas onde se registou a presença de halos de inibição foram *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *L. monocytogenes* LMG 16779 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Quanto aos fungos, as amostras não apresentaram atividade antimicrobiana.

Para *S. aureus* ATCC 25923, apenas 9 cultivares apresentaram halos de inibição, destacando-se as cultivares Coco com $9,70 \pm 0,17$ mm e a Zé Dias Miúdo com $8,10 \pm 0,10$ mm. Em *E. faecalis* ATCC 29212, registou-se atividade antimicrobiana em 10 cultivares, das quais Bonita de S. Brás e Ferraduel apresentaram os valores mais elevados com $7,77 \pm 0,10$ mm e $7,53 \pm 0,08$ mm, respetivamente. No caso de *L. monocytogenes* LMG 16779, encontraram-se apenas 6 cultivares capazes de formar halos de inibição. As cultivares que apresentaram um valor mais próximo do controlo foram a Coco ($8,49 \pm 0,11$ mm), a Ferraduel ($7,93 \pm 0,08$ mm) e a Lourencinha ($7,92 \pm 0,05$ mm). Por fim, para a estirpe *P. aeruginosa* ATCC 27853, verificou-se que 6 cultivares foram capazes de formar halos de inibição, das quais se destacam a Ferraduel ($7,16 \pm 0,13$ mm) e Duro da Estrada ($6,88 \pm 0,11$ mm), valores promissores considerando o controlo de $11,50 \pm 0,58$ mm. Analisando a Tabela 8, destacam-se as cultivares Coco e Ferraduel por apresentarem atividade antimicrobiana contra 3 das espécies de microrganismos estudadas.

Tabela 8 - Atividade antimicrobiana registrada pelos extratos das cultivares (valores apresentados como média n=2 e respectivos desvios padrão, e a análise estatística Fisher LSD $\alpha=0,005$).

Cultivar	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>L. monocytogenes</i> LMG 16779	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750
Coco	9,70 ± 0,17 ^d	6,00 ± 0,00	6,53 ± 0,08 ^{ab}	8,49 ± 0,11 ^d	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Cacela/Manta Rota	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,80 ± 0,13 ^b	7,37 ± 0,20 ^b	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Boa Casta	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,62 ± 0,29 ^{ab}	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Bonita	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,73 ± 0,22 ^{ab}	6,70 ± 0,23 ^a	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Galamba	7,47 ± 0,15 ^b	6,00 ± 0,00	6,55 ± 0,07 ^{ab}	7,62 ± 0,10 ^{bc}	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Zê de Oliveira	7,33 ± 0,30 ^b	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Molar Sales	7,55 ± 0,10 ^b	6,00 ± 0,00	6,37 ± 0,22 ^a	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Lourencinha	7,20 ± 0,13 ^b	6,00 ± 0,00	6,76 ± 0,16 ^b	7,92 ± 0,05 ^c	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Lourencinha de Messines	7,56 ± 0,44 ^b	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Guara	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,71 ± 0,23 ^{ab}	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Marcona	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Cristomorto	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,66 ± 0,30 ^a	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Desmayo	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,39 ± 0,04 ^a	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Duro Amarelo	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,75 ± 0,25 ^{ab}	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Zê Dias Miúdo	8,10 ± 0,10 ^c	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Molar de Alcaria	7,33 ± 0,33 ^b	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Bonita do Calião	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Duro Italiano	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Patarata	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Convento	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Ferralise	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Masbovera	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Francoli	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Lauranne	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Duro da Estrada	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,88 ± 0,11 ^b	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Bonita de S. Brás	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	7,77 ± 0,10 ^c	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Ferragnés	6,61 ± 0,05 ^a	6,00 ± 0,00	6,82 ± 0,28 ^b	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Ferraduel	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	7,53 ± 0,08 ^c	7,93 ± 0,08 ^c	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	7,16 ± 0,13 ^b	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
CN (DMSO 10 µL/disco)	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
CP (Tetraciclina 30 µg/disco)	30,25 ± 0,50	30,00 ± 0,82	20,56 ± 0,74	18,25 ± 0,60	23,25 ± 0,50	18,96 ± 1,05	11,50 ± 0,58	-	-
CP (Anfotericina B 25 µg/disco)	-	-	-	-	-	-	-	20,33 ± 0,48	21,50 ± 0,58

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas entre amostras para $p>0,05$

Capítulo 4

4. Conclusões e Perspetivas Futuras

Os resultados do presente trabalho demonstraram que as cultivares de amêndoa portuguesas oriundas da região algarvia possuem um elevado conteúdo de água comparativamente a cultivares comerciais (Ferragnés, Ferraduel, Marcona, Guara, Cristomorto e Francoli), que cresceram nas mesmas condições que as cultivares nativas da região; um exemplo representativo é a cultivar Molar da Alcaria com $10,0 \pm 2,5\%$ de humidade. Verificou-se que o teor de cinzas não é tão diferente dos valores encontrados na literatura, tendo todas as cultivares apresentado valores semelhantes. Relativamente a outras características, tais como teor de proteína, percentagem de óleo, hidratos de carbono e teor energético, as cultivares da região algarvia apresentaram valores semelhantes ou superiores às cultivares comerciais que se encontram nas mesmas condições edafo-climáticas. A cultivar Zé Dias Miúdo é um excelente exemplo do potencial das cultivares algarvias, apresentando um teor de proteína de $27,7 \pm 1,0\%$, uma percentagem de óleo de $40,97 \pm 0,07\%$, um teor em hidratos de carbono de $24,40 \pm 0,08\%$ e um teor energético de $629,9 \pm 3,8$ kcal. Relativamente à análise mineral, potássio e fósforo foram os principais elementos. A cultivar Coco apresentou-se como uma das melhores cultivares algarvias com valores de $393,89 \pm 67,10$ mg/100 g de p.s. para fósforo e $632,40 \pm 111,08$ mg/100 g de p.s. para potássio.

Na análise do óleo extraído das diversas cultivares, foram determinados parâmetros como índice de acidez, estado oxidativo (índice de peróxidos e determinação de K₂₃₂ e K₂₇₀ e o seu rácio) e a sua composição em ácidos gordos agrupados por saturados, mono- e polinsaturados. O óleo virgem proveniente das cultivares estudadas apresentou um índice de acidez inferior ao máximo estabelecido de 20, apenas a cultivar Boa Casta excedeu o máximo, apresentando um índice de acidez de $24,4 \pm 1,5$ mg KOH/g de óleo, o que demonstra a qualidade do óleo extraído. O estado oxidativo do óleo é o parâmetro mais crucial em óleos virgens. Os óleos estudados demonstraram na generalidade fraco estado oxidativo e dentro dos parâmetros considerados adequados para utilização em medicina. A composição dos óleos foi determinada pela quantidade de MUFA, PUFA e SFA. A maior variabilidade registada verificou-se no conteúdo de MUFA e PUFA. Em geral a o conteúdo de MUFA é o parâmetro mais elevado entrado nos óleos de amêndoa em estudo. Como esperado, o óleo apresenta valores baixos de SFA entre os 7 e 9.

Os resultados obtidos no teor em fenóis total comprovaram que as cultivares Algarvias são superiores às cultivares comerciais, sendo que a única cultivar comercial com maior teor em fenóis totais que as Algarvias foi a cultivar Francoli. Considerando que o teor em fenóis totais pode influenciar positivamente a atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, verificou-se que a cultivar Patarata foi uma das amostras com melhores resultados pois apresentavam os valores mais baixos de IC_{50} : $1,06 \pm 0,02$ mg/mL para o DPPH e um IC_{50} de $4,3 \pm 0,2$ mg/mL para o Sp e tinha um teor em fenóis de $5,1 \pm 0,4$ mg GAE/100 g, superior aos teores verificados nas restantes amostras. As cultivares Algarvias apresentaram resultados razoáveis na sequestração do radical NO, algumas atingindo percentagens superiores a 50%. A capacidade dos extratos para inibir a enzima tirosinase foi na generalidade dos casos inferior a 50%.

O poder redutor dos extratos hidroalcoólicos é inferior ao da Quercetina, utilizada como controlo, indicando que os extratos não possuem capacidade para reduzir o ferro (III) a ferro (II).

No estudo da atividade antimicrobiana verificou-se que os extratos hidroalcoólicos conseguiam inibir o crescimento de alguns dos microrganismos em estudo. Os resultados demonstraram a capacidade dos extratos provenientes das cultivares Coco e Ferraduel serem eficazes contra 3 das espécies de microrganismos estudadas.

Para trabalhos futuros, será necessário caracterizar melhor os óleos, avaliando outros metabolitos e não apenas os ácidos gordos. O mesmo se aplica aos extratos, particularmente para aquelas amostras que apresentaram melhores atividades, de modo a correlacionar com as atividades encontradas. Tendo em consideração que o óleo de amêndoas é muito utilizado em cosmetologia, seria interessante avaliar outros parâmetros importantes nesta indústria. Outra via seria a de verificar a sua potencialidade em nanotecnologia, particularmente em nanoemulsões para fins não só cosméticos, mas também dermatológicos, como veículo para alguns princípios ativos.

Capítulo 5

5. Referências

- Abd El-Hady, Faten K., Mohamed S. Abdel-Aziz, Kamel H. Shaker, and Zeinab A. El-Shahid. 2014. "Tyrosinase, Acetylcholinesterase Inhibitory Potential, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Sponge Derived Fungi with Correlation to Their GC/MS Analysis." *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 26(2):338–45.
- Alasalvar, Cesarettin and Ebru Pelvan. 2011. "Fat-Soluble Bioactives in Nuts." *European Journal of Lipid Science and Technology* 113(8):943–49.
- Associação dos Jovens Agricultores de Portugal. 2017. *Manual Boas Práticas Para Culturas Emergentes A Cultura Da Amêndoa*.
- Barreca, Davide, Seyed Mohammad Nabavi, Antoni Sureda, Mahsa Rasekhian, Roberto Raciti, Ana Sanches Silva, Giuseppe Annunziata, Angela Arnone, Gian Carlo Tenore, İpek Süntar, and Giuseppina Mandalari. 2020. "Almonds (*Prunus Dulcis* Mill. D. A. Webb): A Source of Nutrients and Health-Promoting Compounds." *Nutrients* 12(3):672.
- Barreira, João C. M., Susana Casal, Isabel C. F. R. Ferreira, António M. Peres, José Alberto Pereira, and M. Beatriz P. P. Oliveira. 2012. "Supervised Chemical Pattern Recognition in Almond (*Prunus Dulcis*) Portuguese PDO Cultivars: PCA- and LDA-Based Triennial Study." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(38):9697–9704.
- Barreira, João C. M., Isabel C. F. R. Ferreira, M. Beatriz P. P. Oliveira, and José Alberto Pereira. 2008. "Antioxidant Activity and Bioactive Compounds of Ten Portuguese Regional and Commercial Almond Cultivars." *Food and Chemical Toxicology* 46(6):2230–35.
- Barros, Lillian;, Paula; Baptista, and Isabel C. F. R. Ferreira. 2007. "Effect of *Lactarius Piperatus* Fruiting Body Maturity Stage on Antioxidant Activity Measured by Several Biochemical Assays." *Food and Chemical Toxicology* 45(9):1731–37.
- Boutoub, Oumaima, Soukaina El-Guendouz, Leticia M. Estevinho, Vanessa B. Paula, Smail Aazza, Lahsen El Ghadraoui, Brígida Rodrigues, Sara Raposo, Jorge Carlier, Maria C. Costa, and Maria G. Miguel. 2020. "Antioxidant Activity and Enzyme Inhibitory Potential of *Euphorbia Resinifera* and *E. Officinarum* Honeys from Morocco and Plant Aqueous Extracts." *Environmental Science and Pollution Research* 28(1):503–17.
- Cabrita, Luis, Elena Apostolova, Alcinda Neves, António Marreiros, and José Leitão. 2014. "Genetic Diversity Assessment of the Almond (*Prunus Dulcis* (Mill.) D.A. Webb) Traditional Germplasm of Algarve, Portugal, Using Molecular Markers." *Plant Genetic Resources* 12(S1):S164–67.
- CEAT. 2020. "CEAT." Retrieved (<http://www.rederural.gov.pt/rede-europeia-de-desenvolvimento-rural/33-atividades-da-rrn/pontos-focais/828-centro-de-experimentacao-agraria-de-tavira-abre-portas-a-populacao>).

- Čolić, Slavica D., Milica M. Fotirić Akšić, Kristina B. Lazarević, Gordan N. Zec, Uroš M. Gašić, Dragana Dabić Zagorac, and Maja M. Natić. 2017. "Fatty Acid and Phenolic Profiles of Almond Grown in Serbia." *Food Chemistry* 234:455–63.
- Cordeiro, V., M. Oliveira, J. Ventura, and A. Monteiro. 2001. "Study of Some Physical Characters and Nutritive Composition of the Portuguese's (Local) Almond Varieties." *CIHEAM* 333–37.
- Domingues, Fernanda, Ângelo Luís, Luiza Breitenfeld, Susana Ferreira, and AnaPaula Duarte. 2014. "Antimicrobial, Antibiofilm and Cytotoxic Activities of Hakea Sericea Schrader Extracts." *Pharmacognosy Magazine* 10(37):6.
- El-Guendouz, Soukaina, Smail Aazza, Badiaâ Lyoussi, Maria D. Antunes, Maria L. Faleiro, and Maria G. Miguel. 2016. "Anti-Acetylcholinesterase, Antidiabetic, Anti-Inflammatory, Antityrosinase and Antixanthine Oxidase Activities of Moroccan Propolis." *International Journal of Food Science and Technology* 51(8):1762–73.
- El-Guendouz, Soukaïna, Smail Aazza, Badiaa Lyoussi, Vassya Bankova, Milena Popova, Luís Neto, Maria Leonor Faleiro, and Maria Da Graça Miguel. 2018. "Moroccan Propolis: A Natural Antioxidant, Antibacterial, and Antibiofilm against Staphylococcus Aureus with No Induction of Resistance after Continuous Exposure." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2018.
- Farmacopeia Portuguesa, IX edição, (2008)
- Fernandes, Gabriel D., Raquel B. Gómez-Coca, María Del Carmen Pérez-Camino, Wenceslao Moreda, and Daniel Barrera-Arellano. 2017. "Chemical Characterization of Major and Minor Compounds of Nut Oils: Almond, Hazelnut, and Pecan Nut." *Journal of Chemistry* 2017:5–7.
- Forcada, C. Font i, O. Kodad, T. Juan, and G. Estopañan. 2011. "Genetic Variability and Pollen Effect on the Transmission of the Chemical Components of the Almond Kernel." *Spanish Journal of Agricultural Research* 9(3):781–89.
- Franklin, Lillian M. and Alyson E. Mitchell. 2019. "Review of the Sensory and Chemical Characteristics of Almond (Prunus Dulcis) Flavor." *J. Agric. Food Chem.* 67(10):2743–2753.
- Gervasi, Teresa, Davide Barreca, Giuseppina Lagan, and Giuseppina Mandalari. 2021. "Health Benefits Related to Tree Nut Consumption and Their Bioactive Compounds." *International Journal of Molecular Sciences* 22(11):5960.
- Grané-Teruel, N., M. C. Luna-Amador, M. S. Prats-Moya, V. Berenguer-Navarro, and M. L. Martín-Carratalá. 1999. "Statistical Comparative Study of Free Amino Acid HPLC Data from a Selected Almond Set." *Food Chemistry* 65(1):23–28.
- Ho, Su Chen, Ya Li Tang, Shih Min Lin, and Yih Fong Liew. 2010. "Evaluation of Peroxynitrite-Scavenging Capacities of Several Commonly Used Fresh Spices." *Food Chemistry* 119(3):1102–7.

- Farmacopeia Portuguesa IX Edição. INFARMED - Farmacopeia Portuguesa 9ª edição. Lisboa: Infarmed, 2009. ISBN 978-972-8425-96-8
- Karimi, Zahra, Mojdeh Firouzi, Majid Dadmehr, Seyed Ali Javad-Mousavi, Najmeh Bagheriani, and Omid Sadeghpour. 2020. "Almond as a Nutraceutical and Therapeutic Agent in Persian Medicine and Modern Phytotherapy: A Narrative Review." *Phytotherapy Research* 35(6):2997–3012.
- El Kharraf, Sara, Soukaina El-Guendouz, Abdellah Farah, Bahia Bennani, Maria C. Mateus, El Mestafa El Hadrami, and M. Graça Miguel. 2021. "Hydrodistillation and Simultaneous Hydrodistillation-Steam Distillation of *Rosmarinus Officinalis* and *Origanum Compactum*: Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antibacterial Effect of the Essential Oils." *Industrial Crops and Products* 168(November 2020):113591.
- Kodad, O., G. Estopañán, T. Juan, J. M. Alonso, M. T. Espiau, and R. Socias i Company. 2014. "Oil Content, Fatty Acid Composition and Tocopherol Concentration in the Spanish Almond Genebank Collection." *Scientia Horticulturae* 177:99–107.
- Kodad, O., G. Estopañán, T. Juan, and R. Socias I Company. 2013. "Protein Content and Oil Composition of Almond from Moroccan Seedlings: Genetic Diversity, Oil Quality and Geographical Origin." *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society* 90(2):243–52.
- Laskar, Rajibul Arif, Ismail Sk, Nayan Roy, and Naznin Ara Begum. 2010. "Antioxidant Activity of Indian Propolis and Its Chemical Constituents." *Food Chemistry* 122(1):233–37.
- Lipan, Leontina, Marina Cano-Lamadrid, Laura Vázquez-Araújo, Esther Sendra, Francisca Hernández, Mireia Corel, Alfonso Moriana, and Ángel A. Carbonell-Barrachina. 2021. "How Does Water Stress and Roasting Temperature Affect the Physicochemical Parameters of Almonds?" *Lwt* 150(August 2020).
- Luís, Angelo, Duarte Neiva, Helena Pereira, Jorge Gominho, Fernanda Domingues, and Ana Paula Duarte. 2014. "Stumps of *Eucalyptus Globulus* as a Source of Antioxidant and Antimicrobial Polyphenols." *Molecules* 19(10):16428–46.
- Martins, M., Maria C. M. Pica, Eduardo Ferreira, Gabriel Gonçalves, Dinis Pires, Vasco Ferreira, Maria Henriques, Carla Gomes, Maria Basílio, Maria Massena, Eulália Silva, Valentim Almeida, Nídia Braz, and Fernando Bento. 1999. "Caracterização Física, Química e Organoléptica de Variedades Regionais de Amêndoa." 149.
- Martins, M., R. Tenreiro, and M. M. Oliveira. 2003. "Genetic Relatedness of Portuguese Almond Cultivars Assessed by RAPD and ISSR Markers." *Plant Cell Reports* 22(1):71–78.
- Miguel, Maria Graça, Susana Nunes, Susana Anahi Dandlen, Ana Margarida Cavaco, and Maria Dulce Antunes. 2010. "Phenols and Antioxidant Activity of Hydro-Alcoholic Extracts of Propolis from Algarve, South of Portugal." *Food and Chemical Toxicology* 48(12):3418–23.
- Neves, Maria Alcinda Ramos and Maria da Graça Costa Miguel. 2014. *Características Dos*

Frutos de Variedades de Amendoeira Do Algarve. Vol. 2015.

- Ozcan, Mehmet Musa, Fahad Al Juhaimi, Kashif Ghafoor, Elfadil E. Babiker, and Mustafa Mete Ozcan. 2020. "Characterization of Physico-Chemical and Bioactive Properties of Oils of Some Important Almond Cultivars by Cold Press and Soxhlet Extraction." 57(March):955–61.
- Özcan, Mehmet Musa, Ahmet Ünver, Esin Erkan, and Derya Arslan. 2011. "Characteristics of Some Almond Kernel and Oils." *Scientia Horticulturae* 127(3):330–33.
- Pardo-Giménez, Arturo, Jaime Carrasco, José María Roncero, Manuel Álvarez-Ortí, Diego Cunha Zied, and Jose Emilio Pardo-González. 2018. "Recycling of the Biomass Waste Defatted Almond Meal as a Novel Nutritional Supplementation for Cultivated Edible Mushrooms." *Acta Scientiarum - Agronomy* 40(1):1–9.
- Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia. 2011. "Regulamento (UE) N. o 1169/2011 Do Parlamento Europeu e Do Conselho." 2011:18–63.
- Pedrosa, Sandra Sofia Simões. 2010. "Análise Dos Componentes Do Azeite Utilizando Métodos Quimiométricos." Universidade de Aveiro.
- Peres, Fátima, Luisa L. Martins, Miguel Mourato, Conceição Vitorino, and Suzana Ferreira-Dias. 2016. "Bioactive Compounds of Portuguese Virgin Olive Oils Discriminate Cultivar and Ripening Stage." *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society* 93(8):1137–47.
- Rodrigues, Joana Isabel da Silva. 2019. "Recuperação de Metais de Águas Contaminadas Por Processos Baseados Na Utilização de Extratos Das Plantas Cistus Ladanifer e Erica Andevalensis." Universidade do Algarve.
- Roncero, J. M., M. Álvarez-Ortí, R. Gómez, A. Rabadán, J. Pardo, and A. Pardo-Giménez. 2016. "Virgin Almond Oil: Extraction Methods and Composition." *Grasas y Aceites* 67(3).
- Roncero, J. M., M. Álvarez-Ortí, A. Pardo-Giménez, R. Gómez, A. Rabadán, and J. E. Pardo. 2016. "Almond Virgin Oil: Parameters of Regulated Physicochemical Quality and Stability." *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse* 93(4):237–43.
- Roncero, J. M., M. Álvarez-Ortí, A. Pardo-Giménez, A. Rabadán, and J. E. Pardo. 2020. "Review about Non-Lipid Components and Minor Fat-Soluble Bioactive Compounds of Almond Kernel." *Foods* 9(11):1–26.
- Sakar, El Hassan, Mohamed El Yamani, Abdelali Boussakouran, Ayoub Ainane, Tarik Ainane, Saïd Gharby, and Yahia Rharrabti. 2021. "Variability of Oil Content and Its Physicochemical Traits from the Main Almond [*Prunus Dulcis* Mill. DA Webb] Cultivars Grown under Contrasting Environments in North-Eastern Morocco." *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 32.
- Smail, Aazza; Badiâ; Lyoussi, and Maria G. .. Miguel. 2011. "Antioxidant Activity of Some Moroccan Hydrosols." *Journal of Medicinal Plants Research* 5(30):6688–96.
- Summo, Carmine, Marino Palasciano, Davide De Angelis, Vito M. Paradiso, Francesco Caponio,

- and Antonella Pasqualone. 2018. "Evaluation of the Chemical and Nutritional Characteristics of Almonds (*Prunus Dulcis* (Mill). D.A. Webb) as Influenced by Harvest Time and Cultivar." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98(15):5647–55.
- The Plant List. 2021. "The Plant List." Retrieved (<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/rjp-375>).
- Trindade, Inês Nunes. 2016. "Revalidação Dos Métodos de Análise de Azoto Amoniacal, Azoto Nítrico e Azoto Kjeldahl, Em Lamas e Solos." Universidade Nova de Lisboa.
- USDA Food Database U.S. Department of Agriculture. 2021. "USDA Food Database U.S. Department of Agriculture." Retrieved (<https://fdc.nal.usda.gov/downloaddatasets.html>).
- Yada, Sylvia, Karen Lapsley, and Guangwei Huang. 2011. "A Review of Composition Studies of Cultivated Almonds: Macronutrients and Micronutrients." *Journal of Food Composition and Analysis* 24(4–5):469–80.
- Zahran, Hamdy A., Ahmed Abd-Elsaber, and Hesham Z. Tawfeuk. 2020. "Genetic Diversity, Chemical Composition and Oil Characteristics of Six Sesame Genotypes." *OCL - Oilseeds and Fats, Crops and Lipids* 27.

6. Anexos

Comunicação oral no congresso CMR International Conference on Multidisciplinary Research publicado na revista Millenium.

Carreira L., Neves A., Marreiros A., El-Guendouz S., Luís Â., Anjos O., Miguel G. 2021. Study of some biological activities of 9 almond varieties native from Algarve region. Millenium, 2(ed espec n°8): 70-70.



STUDY OF SOME BIOLOGICAL ACTIVITIES OF 9 ALMOND CULTIVARS NATIVE FROM ALGARVE REGION

Lúis Carreira¹, Alcinda Neves², António Marreiros³, Soukaina El-Guendouz², Ângelo Luís⁴, Ofélia Anjos^{5,6,7}, Graça Miguel^{2,8}

¹ Universidade da Beira Interior, Portugal

² Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, Portugal

³ Direção Regional de Agricultura e Pescas, Portugal

⁴ Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS-UBI), Universidade da Beira Interior, Portugal

⁵ Instituto Politécnico de Castelo Branco, Portugal

⁶ Centro de Estudos Florestais, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Portugal

⁷ Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior, Portugal

⁸ Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development, University of Évora, Portugal

Presenting author: Lúis Carreira | luis.carreira@ubi.pt

Almond is one of the most consumed nuts worldwide, recognized for its health benefits related to the antioxidant capacities and the regulation of immunity and inflammation. The Algarve region has a large germplasm collection of native varieties, from which nine were evaluated relatively to the total phenolics' content (TPC) and the antioxidant activity, which was assessed by the capacity for scavenging free radicals [2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), superoxide anion and nitric oxide (NO)]; and the capacity for inhibiting the tyrosinase (TY) activity using hydroalcoholic extracts was also tested. The higher TPC was found in the hydroalcoholic extract of "Patarata" cultivar, which corresponded to the best capacity for scavenging DPPH free radicals as well superoxide anion radicals. In contrast, the cultivar "Cacela" had the lowest TPC and poor DPPH and superoxide free radical scavenging activities, along with the cultivars "Patarata", and "Zé Dias Miúdo". In what concerns the capacity for scavenging NO free radicals, "Patarata", "Duro da Estrada", "Zé Dias Miúdo", and "Galamba" had similar ability with percentages ranging from 50 to 60% (ascending order). Only one sample had higher than 50% capacity to inhibit TY activity: "Convento" (67%).

The values of antioxidant and anti-inflammatory activities of native Algarve cultivars were similar to cultivars from other regions reported in the literature.

With Principal Components Analyses it was possible cluster some cultivars: the cultivars "Patarata", "Duro da Estrada" and "Zé Duro Miúdo" with higher TPC and antioxidant activity; "Convento" and "Cacela" with lower activity; "D. Amarelo" with higher anti-inflammatory activity.

Keywords: Almond; Algarve cultivars; Antioxidant; Anti-inflammatory; Phenolic compounds