

Desenvolvimento e otimização de um adoçante produzido a partir de arroz

Beatriz Lima de Sousa

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Alimentar

Orientador(es): Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista

Doutora Anabela Cristina da Silva Naret Moreira Raymundo

Júri:

Presidente: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor Antonio Roberto Giriboni Monteiro, Professor Associado do(a) Universidade Estadual de Maringá

Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista, Professora Auxiliar do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Agradecimentos

Primeiramente agradeço à minha orientadora, a Professora Doutora Catarina Prista, o apoio, a orientação, a disponibilidade e o esclarecimento de dúvidas durante a realização das experiências e do desenvolvimento deste trabalho.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Anabela Raymundo, agradeço o apoio, orientação e esclarecimento de dúvidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais agradeço o amor, o carinho e o apoio que me deram, não só nesta fase, como em toda a minha vida.

A todos aqueles que não referi, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

O açúcar, sacarose, é um produto de consumo básico quer pelas suas propriedades como adoçante quer como agente estruturante com diversas funções nos produtos alimentares. Devido à sua importância na alimentação mundial, tem-se vindo a desenvolver produtos alternativos que concedem na mesma um sabor doce aos alimentos, mas sem o seu poder calórico. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um novo produto com poder edulcorante, á base de subprodutos da indústria do arroz da região do Sado, com propriedades mais interessantes que outros adoçantes no mercado, utilizando técnicas de produção de *amazake*.

A otimização do processo de produção começou com a procura da melhor temperatura para a atividade amilolítica e proteolítica, tendo-se obtido melhores resultados aos 45° e 50 °C. A segunda fase foi a otimização da fermentação ou hidrólise do amido, onde se utilizou uma proporção de 5,6 % de *koji* no *amazake*, de modo a não obter características sensoriais indesejadas. As amostras a 50 °C ficaram mais secas e, através da espectrofotometria UV/Visível, obteve-se para a concentração de açúcares o resultado de 144,4 mg/g após 15,5 horas a 45 °C.

Para o processo de secagem, dispôs-se o *amazake* em tiras nos tabuleiros do desidratador e realizou-se uma secagem a 68 °C durante, aproximadamente, 2h30m, tendo em consideração que o tempo de secagem pode alterar dependendo da amostra e deve de ser bastante controlado.

O RRS é constituído por 41,5 g de Hidratos de carbono, que consistem em 64 % de glucose, 21,5 % de maltose e 14,5 % de maltotriose, com um a_w de 0,339, logo não há risco de desenvolvimento microbiano. O produto apresenta um sabor característico não muito doce e não dissolve completamente, não sendo muito bom para utilizar em bebidas, mas apresentou uma capacidade como espessante, comprovada por um teste TPA.

Palavras-chave: adoçante; arroz; *Aspergillus oryzae*; *amazake*.

Abstract

Sugar, or sucrose, is an important commodity in most food products and, due to its importance in the world, alternative sweeteners have been developed in order to grant the same sweet taste but without the its caloric intake. Therefore, the objective of this paper is to develop a product with better properties than other sweeteners already in the market and to take advantage of a sub product of rice crops from the Sado region.

The first step was to select the best temperature for amylolytic and proteolytic activity, and the best results were obtained at 45° and 50 °C. The second phase was the optimization of fermentation, or starch hydrolysis, where a proportion of 5,6 % of *koji* in the *amazake* was used, so as not to get undesired sensory characteristics. At 50 °C the samples appeared drier and, through UV/Visible spectrophotometry, we yielded 144,4 mg/g of carbohydrates, after 15,5 hours, at 45 °C.

For the drying process, the *amazake* was laid in stripes on the dehydrator's trays and it was dried at 68 °C for, approximately, 2h30m, keeping in mind that the drying time could alter depending on the sample and should be thoroughly controlled.

The RRS is comprised of around 41,5 g of carbohydrates, of which 64 % are glucose, 21,5 % is maltose and 14,5 % is maltotriose. It also has a a_w of 0,339, and so there isn't a risk of microorganism growth. This product also exhibits a characteristic taste, isn't very sweet and doesn't dissolve completely, so it shouldn't be applied in beverages. It displayed, however, a thickening quality, confirmed with a TPA test.

Key words: sweetener; rice; *Aspergillus oryzae*; *amazake*.

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Índice de figuras	VII
Índice de tabelas	VIII
Lista de abreviaturas	IX
1. Introdução e Objetivos	1
2. Enquadramento Teórico	3
2.1. Novas tendências de consumo: sustentabilidade e inovação	3
2.2. Arroz Carolino	4
2.3. Compostos adoçantes	5
2.3.1. Sacarose	5
2.3.2. Edulcorantes Naturais e Sintéticos	7
2.4. Amido	8
2.5. <i>Amazake</i>	10
2.5.1. <i>Aspergillus oryzae</i>	10
2.5.2. Processos de produção de <i>amazake</i>	12
2.6. Propriedades Físico-químicas dos Alimentos	12
2.6.1. Perfil Nutricional	12
2.6.2. Atividade da água (a_w)	14
2.6.3. Avaliação das propriedades dos alimentos	15
3. Desenvolvimento Experimental	18
3.1. Microrganismos e matérias primas	18
3.2. Produção de RRS	18
3.2.1. Preparação da matéria prima	18
3.2.2. Produção de <i>koji</i>	18
3.2.3. Hidrólise enzimática (produção de <i>amazake</i>)	19
3.2.4. Desidratação e Moagem	19

3.3. Análises físico-químicas.....	20
3.3.1. Quantificação do amido	20
3.3.2. Quantificação dos açúcares redutores	20
3.3.3. Quantificação da proteína.....	21
3.3.4. Quantificação dos lípidos.....	22
3.3.5. Quantificação das cinzas	23
3.3.6. Determinação da atividade de água	23
3.4. Análise de atividade enzimática.....	23
3.4.1. Obtenção de extrato enzimático	23
3.4.2. Atividade proteolítica.....	24
3.4.3. Atividade amilolítica.....	24
3.5. Desenvolvimento de produtos/aplicações	24
3.5.1. Adoçante de solução aquosa.....	24
3.5.2. Adoçante em iogurte	25
3.5.3. Adoçante em pudins e geleias.....	25
3.5.4. Adoçante em bolachas.....	25
3.6. Análise Sensorial.....	25
3.6.1. Perfil de textura	25
3.6.2. Provas afetivas	25
3.7. Tratamento estatístico	26
3.8. Avaliação do custo e rendimento de produção.....	26
4. Resultados e Discussão,	27
4.1. Otimização do processo de produção do RRS.....	27
4.1.1. Otimização da variável temperatura em relação à atividade enzimática.....	27
4.1.2. Otimização das condições de hidrólise do arroz	29
4.1.3. Otimização da desidratação	31
4.2. Caracterização do RRS.....	32
4.2.1. Perfil Nutricional	32
4.2.2. Avaliação das aplicações do RRS.....	33
4.3. Análise de custos e rendimento do processo de produção de RRS.....	39

5. Conclusões e perspectivas futuras	42
6. Bibliografia	43
7. Anexos	49
7.1. Reta de calibração da proteína solúvel.....	49
7.2. Reta de calibração do amido	50
7.3. Reta de calibração dos açúcares redutores pelo método DNS	51
7.4. Retas de calibração da glucose, maltose e maltotriose por HPLC	52
7.4.1. Reta de calibração da glucose.....	52
7.4.2. Reta de calibração da maltose	53
7.4.3. Reta de calibração da maltotriose	54
7.5. Ficha de análise sensorial prova afetiva.....	55

Índice de figuras

Figura 1 - Colheita do arroz (Carreiro, 2008).	4
Figura 2 - Estruturas primária e secundária da amilose (a) e da amilopectina (b) (Blanshard et al., 1979).....	9
Figura 3 - estrutura molecular da glucose, maltose, maltotriose e dextrina (Wikipedia).....	9
Figura 4 - <i>Aspergillus oryzae</i> (Hazzaa et al., 2013).	11
Figura 5 - koji após 3 dias de desenvolvimento.	11
Figura 6 - Preparação do koji em tabuleiros (South River Miso Company).	12
Figura 7 - Mistura de koji no arroz para produção de amazake (Chen, 2018).	12
Figura 8 - Esquema de um sistema de extração Soxhlet (Costa et al., 2017).	13
Figura 9 – Reações químicas e bioquímicas e crescimento microbiano em função da atividade da água (Lewandowski et al., 2018).	15
Figura 10 - Exemplo de uma curva obtida de um teste TPA realizada ao queijo cheddar (Texture Technologies).	16
Figura 11 - Concentração de glucose nos amazakes produzidos com trinca cozida durante 10 minutos, a 45 °C. No âmbito da otimização da fermentação.	30
Figura 12 – Secagem realizada no forno, a uma temperatura de 135 °C, durante 20, 30 e 40 minutos.	31
Figura 13 - Secagem realizada no desidratador, a uma temperatura de 68 °C, durante 4 e 5 horas.....	31
Figura 14 - Tira de RRS, feita a partir de amazake de trinca, desidratada a 68 °C, durante 2h30m.....	32
Figura 15 - Resultados do teste de TPA para a geleia, com sacarose e com RRS, e para o pudim, com sacarose e com RRS. (Barras com letras diferentes são significativamente diferentes segundo a ANOVA a um nível de significância de 5% (Anexo I)).	34
Figura 16 - 1 g de RRS dissolvido em água.....	35
Figura 17 - Solução de água com 1 g de RRS após repousar.	35
Figura 18 - Solução controlo de café solúvel (à esquerda), café com RRS de 0,5 mm (no centro) e café com RRS de 2 mm (à direita).	35
Figura 19 - Iogurte de controlo com açúcar (à esquerda) e iogurte com RRS (à direita).	36
Figura 20 - Na primeira imagem está a geleia com RRS (esquerda) e a geleia com açúcar (direita). Na segunda imagem têm-se o pudim confeccionado com açúcar (esquerda) e o pudim com RRS (direita).....	36
Figura 21 - Resultados do teste afetivo aos pudins com RRS para: Textura, Sensação doce, Apreciação global e Intenção de compra.	37
Figura 22 - Resultados do teste afetivo às bolachas com RRS para: Textura, Sensação doce, Apreciação global e Intenção de compra.	38

Figura 23 - Resultados do teste afetivo ao iogurte com RRS para: Textura, Sensação doce, Apreciação global e Intenção de compra.	39
Figura 24 - Fluxograma do processo de produção de RRS.....	40
Figura 25 - Curva de calibração para determinar a concentração de proteína.....	49
Figura 26 - Curvas de calibração para determinar a concentração do amido. A primeira curva (esquerda) compreende concentrações entre 0 e 10 mg/mL e a segunda curva (direita) abrange concentrações entre 15 e 50 mg/mL.....	50
Figura 27 - Curva de calibração para determinar a concentração de açúcares redutores. ...	51
Figura 28 - Curva de calibração para determinar a concentração de glucose.....	52
Figura 29 - Curva de calibração para determinar a concentração de maltose.....	53
Figura 30 - Curva de calibração para determinar a concentração de maltotriose.....	54

Índice de tabelas

Tabela 1 - Características Químicas do Arroz Carolino (DGADR, s.d.).	4
Tabela 2 - Preço de diversos adoçantes presentes no mercado (Continente; Celeiro).....	5
Tabela 3 - Concentração de proteína presente no sobrenadante obtido do <i>Aspergillus oryzae</i> , com diferentes diluições.....	27
Tabela 4 - Concentração de amido e de glucose presentes na solução com o sobrenadante com uma diluição de 1:50, obtidas nos vários tempos e temperaturas da análise e a respetiva atividade da amilase calculada.....	28
Tabela 5 - Concentração de proteína na solução às várias temperaturas, após 2, 5 e 10 minutos.....	28
Tabela 6 - Concentração de glucose nos amazakes produzidos com arroz cozido durante 1h30 a 45 °C e a 50 °C, após 5, 6 e 15,5 horas. No âmbito da otimização da fermentação.	29
Tabela 7 - Concentração de glucose nos amazakes produzidos com trinca cozida durante 1h30, a 45 °C. No âmbito da otimização da fermentação.....	30
Tabela 8 - Perfil nutricional do RRS.	32
Tabela 9 - Cálculo do custo de utilização dos vários equipamentos utilizados na produção do Koji e do RRS. (o primeiro valor apresentado para a Bimby equivale à cozedura do arroz para o koji e o segundo valor à cozedura do arroz para o amazake.)	40
Tabela 10 - Quantidades necessárias dos reagentes para as diferentes concentrações de caseína.....	49
Tabela 11 - Quantidades necessárias dos reagentes para as diferentes concentrações de amido.....	50
Tabela 12 - Quantidades necessárias dos reagentes para as diferentes concentrações de maltose.....	51

Tabela 13 - Área dos picos e respectivos tempos de retenção para as várias concentrações de glucose, obtidos na análise HPLC.....	52
Tabela 14 - Concentrações de glucose e respectivas razões entre a área 1 e 2.....	52
Tabela 15 - Razão entre a área 1 e 2 obtidas no HPLC, para a glucose.....	52
Tabela 16 - Área dos picos e respectivos tempos de retenção para as várias concentrações de maltose, obtidos na análise HPLC.....	53
Tabela 17 - Concentrações de maltose e respectivas razões entre a área 1 e 2.....	53
Tabela 18 - Razão entre a área 1 e 2 obtidas no HPLC, para a maltose.....	53
Tabela 19 - Área dos picos e respectivos tempos de retenção para as várias concentrações de maltotriose, obtidos na análise HPLC.....	54
Tabela 20 - Concentrações de maltotriose e respectivas razões entre a área 1 e 2.....	54
Tabela 21 - Razão entre a área 1 e 2 obtidas no HPLC, para a maltotriose.....	54

Lista de abreviaturas

a_w – Atividade da água

ANOVA – Análise de variância

HPLC - *High performance liquid chromatography*

RRS - River Rice Sugar[®]

TPA - *Texture Profile Analysis*

UHT – *Ultra high temperature* ou Ultrapasteurização

1. Introdução e Objetivos

O açúcar é um produto que tem uma grande importância na sociedade. Há vários séculos atrás, o açúcar era utilizado na Índia como um tempero e medicamento. No entanto, ele não era facilmente adquirido e, como alternativa, adocicavam os alimentos com mel. Este passou a ser comercializado pelos gregos, após a sua descoberta por Alexandre, o Grande, e posteriormente pelos romanos, mas era apenas comercializado em pequenas quantidades (Januário, 2014).

O refinamento do açúcar começou com os persas, de modo a melhorar o seu estoque, transporte e comércio sem que ele fermentasse. A conquista da Pérsia pelos árabes em 650 d.C. expandiu o açúcar pelo seu império e iniciou o cultivo da cana-de-açúcar em mais regiões, iniciando a produção de açúcar sólido ao longo do Mediterrâneo (Januário, 2014). Durante centenas de anos, o açúcar foi considerado um produto gastronómico e medicinal de luxo, sendo uma especiaria extremamente rara e valiosa. No século XII, o cultivo estendeu-se às regiões da Grécia, do Sul de Itália e do Sul de França. No entanto a sua produção continuava a ser muito reduzida, sendo que os orientais continuavam a ser os maiores fornecedores de açúcar (Sidul, s.d.).

No início do século XV, introduziu-se o cultivo da cana-de-açúcar na Madeira, permitindo a Portugal vender açúcar ao resto da Europa. Depois, com a passagem do cabo da Boa Esperança, os portugueses passaram a viajar para a Índia com bastante regularidade, tornando-os os maiores negociantes de açúcar (Sidul, s.d.).

A produção de cana-de-açúcar na América do Sul começou com a chegada de Cristóvão Colombo à América, em 1493, sendo que levava consigo alguns exemplares de cana-de-açúcar provenientes das Canárias. Com a descoberta do Brasil, em 1500, os portugueses decidiram, também, apostar na instalação de plantações de grandes dimensões, aumentando, assim, a sua produção de açúcar (Sidul, s.d.).

Atualmente, o açúcar consumido é extraído, não só da cana-de-açúcar, mas da beterraba. O cultivo da beterraba em grande escala começou no início do século XIX, quando uma guerra marítima entre a França e Inglaterra impediu a importação do açúcar da cana (Fraia, 2015).

A beterraba sacarina que se cultiva na Europa é também conhecida como beterraba branca e é uma planta de crescimento rápido e bem-adaptada ao clima temperado. Esta é da mesma espécie que a beterraba vermelha e é resultante de um lento processo de seleção. Ao longo do tempo, as variedades sacarinas tornaram-se mais claras e doces (Fraia, 2015).

O açúcar é, então, um edulcorante natural, constituído essencialmente por sacarose, sendo que, o termo “açúcar” está associado à sacarose. Este tem um elevado poder edulcorante

(sabor doce), um elevado valor energético (valor calórico), um elevado poder de conservação, uma elevada solubilidade em água, apresenta uma capacidade estruturante, sendo que, ajuda no processo de gelificação, conferindo estrutura e volume ao produto, e atua como um humectante, ou seja, estabelece ligações com as moléculas de água no alimento, reduzindo, assim, a atividade da água (a_w) neste, aumentando o seu tempo de conservação (Januário, 2014).

Hoje em dia, há uma necessidade de encontrar um adoçante que tenha um elevado poder edulcorante, mas com baixo valor energético. Assim, originaram os adoçantes sintéticos, como a sacarina, o acessulfame k e o ciclomato, entre outros, e os adoçantes naturais, como o esteviosido (obtido da *Stevia rebaudiana*), a glicirrizina (obtido do alcaçuz), etc. Estes não são metabolizados pelo organismo, logo são não calóricos. Tem-se, também, como alternativa a frutose, que é um monossacarídeo constituinte da sacarose e apresenta um poder edulcorante superior à sacarose, podendo ser utilizado em pequenas quantidades e tem um baixo índice glicémico, e o sorbitol, que é um poliálcool higroscópico, que não promove cáries, por outro lado, quando ingerido em excesso, tem um efeito laxativo. Muitos destes adoçantes só têm a capacidade de adoçar os alimentos, sendo que, para certos produtos há uma necessidade de adicionar estruturantes para se obter a textura desejada (Weihrauch et al., 2004; Januário, 2014).

Este trabalho baseia-se, portanto, no desenvolvimento de um adoçante que apresente propriedades mais saudáveis que os outros adoçantes já disponíveis no mercado e o estudo da sua aplicabilidade em diferentes matrizes alimentares. Tem-se, ainda, como objetivo valorizar os subprodutos das culturas arrozais da região do Sado, tendo em consideração que o River Rice Sugar[®] (RRS) vai ser produzido a partir da trinca de arroz carolino, típico dessa região.

A ideia originou de um outro produto já existente no Japão há vários séculos, o *amazake*. Este é uma bebida doce, não alcoólica, produzida a partir da fermentação de uma mistura de arroz cozido com arroz *koji*. Por sua vez, o arroz *koji* é obtido através do desenvolvimento do fungo *Aspergillus oryzae* em arroz cozido a vapor (Oguro, 2017).

O processo de produção do RRS vai ser parecido ao do *amazake*, sendo que se vai acrescentar um processo de secagem e moagem, de modo a obter um produto com um aspeto parecido ao açúcar.

2. Enquadramento Teórico

2.1. Novas tendências de consumo: sustentabilidade e inovação

A industrialização foi importante para o aumento da produção alimentar de modo a responder às necessidades do aumento da população, no entanto neste sistema existe um grande desperdício e é muito prejudicial ao ser humano. O fácil acesso aos produtos alimentares favoreceu o desperdício de comida não ingerida, considerando que uma parte da população passa fome, só uma pequena percentagem dos subprodutos resultantes do processamento industrial é reutilizada e uso de pesticidas e fertilizantes sintéticos que podem contaminar o solo e as águas. Este é um sistema linear, onde uma proporção muito alta de produtos alimentares flui para as cidades onde são processados ou consumidos, criando resíduos orgânicos sob a forma de alimentos descartados, subprodutos ou esgoto (Ellen Macarthur Foundation).

Nos últimos anos, tem havido uma alteração na tendência alimentar da população, sendo que, há um aumento da preferência do consumo de proteína à base de plantas, que alimentos de produção orgânica e/ou local, de alimentos cultivados com maior regeneração, o que pode ser indicativo de tendências globais de longo prazo. Também tem havido um grande desenvolvimento na tecnologia e inovação, originando alternativas aos produtos alimentares atuais. Estas novas tendências abrem a hipótese de estabelecer um sistema alimentar circular, que é um sistema mais sustentável (Rosendo, 2018).

A economia circular é um conceito estratégico que assenta na redução, reutilização, recuperação e reciclagem de materiais e energia, substituindo o conceito de fim-de-vida da economia linear (Rosendo, 2018).

Uma economia alimentar circular tem como objetivo recriar os sistemas naturais de regeneração, para que não existam resíduos, indo estes ser matéria-prima para outro ciclo, livres de pesticidas ou outros contaminantes químicos. Os seus princípios são, então, acabar com os desperdícios e a poluição, reutilizar e reciclar e evitar o uso de recursos não renováveis. Para tal teria de se produzir os alimentos de maneira regenerativa e se possível mais local, utilizar o máximo possível dos produtos alimentares e conceber e comercializar produtos alimentares mais saudáveis (Ellen Macarthur Foundation).

2.2. Arroz Carolino

O arroz é um alimento extremamente importante, sendo que a maioria da população mundial o consome. O arroz carolino provém da planta *Oryza sativa* L. (subespécie Japónica). Esta é uma plantação anual, realizada em sistema de monocultura, recorrendo à técnica de alagamento constante dos campos cultivados (DGADR, s.d.).



Figura 1 - Colheita do arroz (Carreiro, 2008).

Esta planta pode ser cultivada em quase todos os solos, desde arenosos a argilosos, desde que esta tenha água suficiente para o seu desenvolvimento. Assim, ela consegue-se sustentar em terras e águas salgadas e tolera grandes variações de pH (entre 4,5 e 8,7) (DGADR, s.d.).

De maneira a obter o arroz que compramos, este, após a colheita tem de passar por uma secagem, pelo descasque e pelo processo de branqueamento, onde se elimina, por abrasão, o pericarpo até se obter o branco desejado. De seguida realiza-se o polimento, onde são removidas as partículas de farinha agarradas ao grão. Por fim, dá-se a separação dos grãos de arroz inteiros dos grãos partidos, denominados de trinca de arroz, e dá-se uma última seleção onde são retirados os grãos de arroz que não apresentam a tonalidade certa. Ocorrem, ainda, processos de lavagem antes da secagem e do descasque (DGADR, s.d.).

O arroz é maioritariamente constituído por amido, com uma concentração á volta de 80%, fornecendo, também, proteínas, vitaminas, minerais e um baixo teor de lípidos, por volta de 1%. As concentrações dos vários constituintes vão ser influenciados pela variedade de arroz, pelas variações ambientais e o seu processamento. Os seus componentes também não estão uniformemente distribuídos pelo grão, ou seja, o amido concentra-se principalmente no centro e as camadas mais externas têm uma maior concentração de proteínas, lípidos, fibras, minerais e vitaminas (Walter et al., 2008).

Tabela 1 - Características Químicas do Arroz Carolino (DGADR, s.d.).

Parâmetros	Valores Médios (± 5 %)
Gordura (%)	0,9 – 1,3
Proteína (%)	5,2 – 6,8
Hidratos de Carbono (%)	77,1 – 82,3
Valor energético (Kcal / 100g)	346,5 – 350,1

2.3. Compostos adoçantes

2.3.1. Sacarose

Os hidratos de carbono, também conhecidos como glúcidos ou “açúcares”, são moléculas constituídas por átomos de carbono, oxigénio e hidrogénio e podem formar desde monossacáridos a polissacáridos (Tomasik, 2004).

O açúcar utilizado na cozinha é, essencialmente, sacarose. Este é um oligossacárido ou, neste caso, um dissacárido, constituído por uma molécula de glucose e outra de frutose (Nabors, 2012).

O açúcar é produzido da cana-de-açúcar ou da beterraba sacarina, através de um processo de cristalização dos açúcares que estas contêm naturalmente, e os maiores produtores de cana-de-açúcar são o Brasil, a Índia e a China e os de beterraba sacarina a Rússia a França e a Alemanha. A produção do Brasil de cana-de-açúcar é de 758 548 292 toneladas e a produção na Rússia de beterraba sacarina de 51 933 913 toneladas. Portugal também é um produtor de açúcar, mas apenas produz cerca de 5000 toneladas de cana-de-açúcar e 16 000 toneladas de beterraba sacarina, muito pouco comparando com a produção mundial (FAO, 2017).

Atualmente existem vários substitutos ao açúcar convencional, inclusive açúcar de coco, no entanto, estes têm um preço comercial muito elevado comparativamente com o açúcar (Tabela 2). Tem é de se ter em conta, também, que devido ao elevado poder edulcorante de alguns dos adoçantes comparativamente com a sacarose, a quantidade utilizada desse adoçante vai ser inferior à necessária se se utilizasse sacarose, por exemplo, uma colher de açúcar é equivalente a 24 mg de aspartame (Nabors, 2012).

Tabela 2 - Preço de diversos adoçantes presentes no mercado (Continente; Celeiro).

	Preço (€/kg)
Açúcar Branco	0,69
Aspartame	6,61
Aspartame e Acessulfame k	22,11
Ciclomato e Sacarina	15,92
Stevia	17,50
Frutose	4,59
Xilitol	25,60
Açúcar de Coco	9,95

2.3.1.1. Papel desempenhado nos alimentos e bebidas

O açúcar, para além de ser um nutriente energético, também confere propriedades características como sabor, textura, estabilidade e volume, quando presente nos alimentos.

Quando está cristalizado, o açúcar não apresenta nem odor, nem cor e é um adoçante muito versátil (SRAS).

O açúcar tem, então, vários usos na indústria alimentar, para além de adoçar, ele é humectante e funciona como um conservante, prevenindo o crescimento de microrganismos, é a base da fermentação, por exemplo para a confeção de pão, é um agente estruturante, isto é, ajuda a criar matrizes mais estáveis, é um intensificador de sabor. O grau de cristalização, a humidade e o tamanho dos cristais são os fatores que vão controlar o efeito do açúcar na textura dos alimentos (SRAS).

Os Açúcares com a ação de calor podem sofrer transformações, a caramelização e a reação de Maillard, onde ocorre a formação de compostos voláteis e polímeros complexos de cor acastanhada. Para se dar a reação de Maillard, é necessário haver proteínas presentes. Estas reações vão conferir uma cor acastanhada e alterar o sabor, o que pode ser o pretendido como, por exemplo, na produção de cerveja ou de café (Tomasik, 2004).

2.3.1.2. Importância para a saúde

Os hidratos de carbono são degradados no nosso organismo através das amilases, que são produzidas pelas glândulas salivares e pelo pâncreas, elas vão hidrolisar os polissacáridos em moléculas simples, que vão fornecer energia ao nosso corpo (More et al., 2012).

Apesar do açúcar ser necessário para o corpo humano, o seu consumo em excesso é prejudicial. Ao ingerir mais açúcar que o nosso corpo precisa, este tem de encontrar outra coisa para fazer com essa energia extra, ou seja, armazená-la como massa gorda, promovendo a obesidade. O seu consumo também favorece o aparecimento de cáries (Nabors, 2012).

Em Portugal, mais metade da população apresenta excesso de peso e perto de um milhão de adultos sofre de obesidade. O excesso de peso leva ao aumento do risco de doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, dislipidemia e diabetes tipo 2 (Fundação Portuguesa de Cardiologia; INE).

A Diabetes ocorre quando o pâncreas não é capaz de produzir insulina em quantidade suficiente ou quando o organismo é resistente ao seu desempenho. A insulina é uma hormona produzida pelo pâncreas, responsável por ajudar a glucose a passar do sangue para o interior das células, a sua falta no nosso organismo vai resultar em excesso de glucose no sangue. Este excesso vai fazer com que o organismo entre em hiperglicemia, ou seja, a glucose acumula-se no sangue, deteriorando progressivamente os vasos sanguíneos. Esta deterioração torna mais frequente as doenças cardiovasculares, como a angina de peito, o enfarte agudo do miocárdio e a morte cardíaca súbita em doentes diabéticos (Fundação Portuguesa de Cardiologia).

Existem dois tipos de diabetes, tipo 1 e tipo 2. A diabetes tipo 2 é mais comum e está associada ao excesso de peso e obesidade, nesta o pâncreas é capaz de produzir insulina, mas um estilo de vida pouco saudável tornaram a insulina ineficaz. A Diabetes tipo 2 tem vindo a aumentado em todo o mundo e é mais comum em pessoas com mais de 40 anos, mas devido à obesidade, é cada vez mais frequente entre os jovens (Fundação Portuguesa de Cardiologia).

2.3.2. Edulcorantes Naturais e Sintéticos

Os adoçantes são de grande interesse e têm vindo a ser investigados há vários anos com o objetivo de encontrar o mais parecido com o adoçante perfeito que se conseguir. Este deve de ser, pelo menos, tão doce como a sacarose e com um sabor semelhante, incolor, inodoro e não tóxico ou carcinogénico, deve ser solúvel em água, estável em diferentes condições de pH e de temperatura e ter uma longa *shelf life*, também deve de ser facilmente produzido, armazenado e transportado e ter um preço competitivo com a sacarose ou outros adoçantes comparáveis. Contudo, obter todas estas características perfeitas é impossível (Nabors, 2012).

O uso de adoçantes oferece opções de produtos alimentares que ajudam a controlar as calorias ingeridas ou na manutenção do peso, também, no manejo dos diabetes e/ou cáries, a melhorar a aceitação de certos produtos farmacêuticos e cosméticos e podem ser utilizados como alternativa em caso de escassez de açúcar (Nabors, 2012).

Nenhum adoçante é perfeito para qualquer produto e ter uma variedade por onde escolher permite que os fabricantes usem o ingrediente ou combinação de ingredientes mais adequado a um certo produto. A maioria dos adoçantes são não calóricos, pois não são metabolizados pelo corpo humano e não promovem cáries ou influenciam a secreção de insulina, logo são adequados ao consumo por diabéticos. Entre estes estão:

O acessulfame de potássio (acessulfame k), ele dissolve-se bem em água e torna as soluções neutras, é 200 vezes mais doce que a sacarose, mas em soluções aquosas tem um sabor um pouco amargo, bebidas com acessulfame k podem ser pasteurizadas, esterilizadas e UHT sem haver perdas e instabilidade (Nabors, 2012).

O aspartame é ligeiramente solúvel em água e álcool e dependendo se é utilizado em sólidos ou líquidos ele apresenta um poder edulcorante entre 160 a 220 vezes maior que a sacarose, em condições secas é bastante estável, mas é afetado por temperaturas muito elevadas, este também realça outros sabores nos produtos, como, por exemplo, o sabor ácido das frutas nas pastilhas elásticas, podendo prolongá-lo até quatro vezes mais (Nabors, 2012).

O aspartame-acessulfame origina da união de uma molécula de aspartame e outra de acessulfame k, esta mistura oferece uma maior estabilidade do sabor doce e uma maior *shelf*

life, tem uma rápida dissolução e é 350 vezes mais doce que a sacarose, tem, também, uma higroscopicidade praticamente nula, mesmo quando exposto a uma humidade relativa muito alta (Nabors, 2012).

O ciclomato tem uma boa solubilidade e é 30 vezes mais doce que a sacarose, no entanto, com o aumento da sua concentração a intensidade do doce tende a diminuir e a ganhar um sabor amargo que perdura. Ele tem uma estabilidade excelente a qualquer gama de temperatura e de pH e na presença de luz, oxigénio e outros químicos. O ciclomato é frequentemente utilizado em conjunto com a sacarina, sendo que, o poder edulcorante é maior do que seria de esperar e o sabor residual indesejado é minimizado. Doses muito grandes de ciclomato podem causar diarreias, mas o seu uso é limitado devido à toxicidade do metabolito do ciclomato, a ciclohexilamina (Nabors, 2012).

A sacarina é instável quando aquecida e na sua forma ácida é insolúvel, sendo que, esta é normalmente usada na sua forma de sal de sódio ou sal de cálcio. A sacarina tem um poder edulcorante 300 vezes maior que o da sacarose, mas também tem um sabor residual desagradável que aumenta com o aumento da sua concentração. A sacarina é, então, muito utilizada com outros adoçantes, principalmente com o ciclomato e o aspartame (Nabors, 2012).

A stevia pode ser constituída por diferentes glicosídeos, apesar de que, dos dez compostos identificados, tenta-se evitar extratos com maioritariamente esteviosido, para extratos com primariamente rebaudiosido A. O rebaudiosido A é mais estável que o esteviosido e tem um poder edulcorante superior, entre 200 a 300, que o esteviosido, entre 150 a 250 vezes superior à sacarose, e o esteviosido apresenta, também, um sabor mais amargo (Nabors, 2012).

O sorbitol e o xilitol são adoçantes alternativos também calóricos, mas a um nível muito inferior ao da sacarose. Eles são polióis, cujo consumo elevado pode ter um efeito laxativo. O sorbitol é higroscópico, logo é utilizado como um humectante e é processado no corpo maioritariamente como frutose, ou seja, pode ser consentido para diabéticos, no entanto é menos doce que a sacarose. O xilitol por outro lado tem o mesmo nível de doçura da sacarose, não é um bom substrato para a placa bacteriana nos dentes, logo ajuda a evitar cáries, e inibe o crescimento e a fermentação das leveduras, por isso, não pode ser usada em produtos dependentes de leveduras (Nabors, 2012).

2.4. Amido

O amido constitui a maior reserva de alimento das plantas e é armazenado dentro dos plastídeos, na forma de grânulos insolúveis em água. A forma, tamanho e propriedades dos grânulos de amido são extremamente variadas e vão depender da sua origem. O amido em

geral pode ser dividido em dois polímeros: amilose, formada essencialmente por polímeros lineares, e a amilopectina, uma mistura de vários polímeros ramificados (Banks et al., 1975).

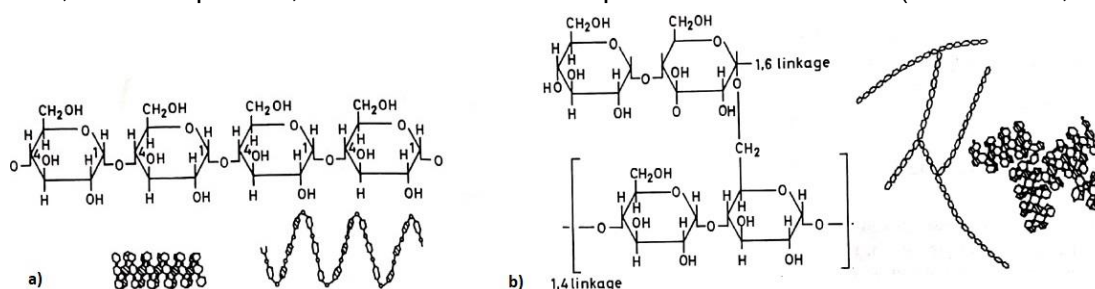


Figura 2 - Estruturas primária e secundária da amilose (a) e da amilopectina (b) (Blanshard et al., 1979).

O amido é, então, constituído por dois polissacáridos:

A amilose, cujo as moléculas têm, maioritariamente, uma estrutura linear com ligações glicosídicas α -1,4, sem ramificações, com cerca de 200-1000 resíduos de glucose. Esta é instável em soluções aquosas, sendo que tem uma tendência para precipitar. A maioria dos amidos estudados contêm à volta de 15-25 % de amilose (Blanshard et al., 1979).

A amilopectina, que é constituída por várias cadeias de glucose com ligações α -1,4, interligadas com ligações glicosídicas α -1,6, formando uma estrutura ramificada. Estas moléculas são bastante grandes, apresentando entre 2000 e 20 000 resíduos de glucose. A amilopectina é estável em soluções aquosas e a sua forma, propriedades e degradação enzimática vão ser determinadas pelas diferentes ramificações da molécula (Blanshard et al., 1979).

Existem várias enzimas que atuam sobre estas ligações, de maior importância temos a α -amilase que catalisa a hidrólise do amido, esta atua nas ligações glicosídicas α -1,4, exceto nas ligações do final das cadeias e quando estão perto de ligações α -1,6. Esta enzima origina maioritariamente maltose e, em menores quantidades, glucose e maltotriose, origina também, a partir da amilopectina, α -dextrina. As α -amilases conseguem hidrolisar parte dos grânulos de amido, criando buracos na estrutura, e eventualmente solubilizá-los (Blanshard et al., 1979).

Para completar a hidrólise atuam, ainda, as β -amilases que funcionam nas ligações α -1,4 e tendem a parar antes das ligações α -1,6, originando α -dextrinas. Para fragmentar os oligossacáridos

(α -dextrina) existem as α -glucosidases, β -glucosidases e as glucoamilases, que atua nas

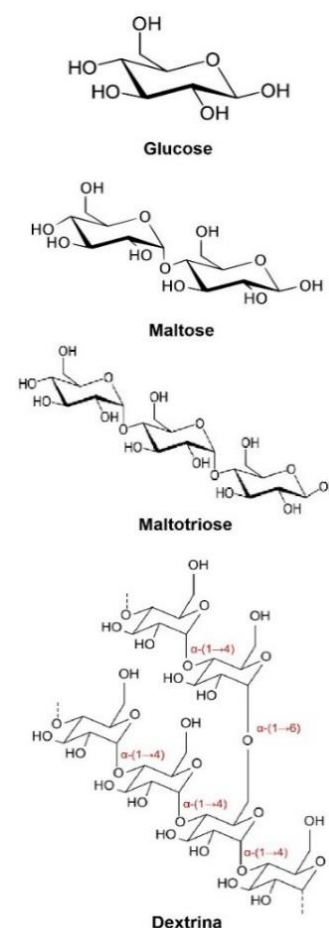


Figura 3 - estrutura molecular da glucose, maltose, maltotriose e dextrina (Wikipedia).

ligações glicosídicas α -1,4, libertando as glucoses nas pontas das moléculas (Blanshard et al., 1979).

Na indústria alimentar os amidos mais utilizados são de origem do milho e da batata, seguidos do trigo, arroz e mandioca.

2.5. Amazake

O *amazake*, cujo nome significa *sake* doce, é uma bebida de origem Japonesa, doce e cremosa, que pode ser servida quente ou fria, e é produzido a partir de arroz fermentado. Esta bebida já existe há vários anos, remetendo ao período Kofun (300-538 AD), e é hoje ainda muito popular (Chen, 2018).

Existem dois tipos de *amazake*, um é produzido através das borras do *sake*, isto é, é feito com as borras que ficam da produção do *sake*, sendo que, as borras são dissolvidas em água quente com adição de açúcar e no final vai ter um teor alcoólico de 8 %. A outra hipótese, explorada neste projeto, é a produção com arroz *koji*, onde se utiliza arroz, água e arroz *koji*, originando uma bebida não alcoólica (Chen, 2018).

O arroz *koji* ou só *koji* é obtido através do desenvolvimento do fungo *Aspergillus oryzae* em arroz cozido a vapor e pode depois ser adicionado a outras matérias-primas, por exemplo soja ou arroz, de modo a obter produtos fermentados: molho de soja e *miso* (soja) e *amazake* e *sake* (arroz) (Chen, 2018).

O *amazake* feito com *koji* tem mais valor nutricional que o feito com as borras do *sake*, incluindo nutrientes como vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, ácido fólico, ácido ferúlico, glutamina, fibras e grandes quantidades de glucose. Ele é considerado um probiótico, que tem como benefícios anti fadiga, fortalecer o sistema imunitário, ajudar na digestão e na flora intestinal e é bom para a pele (Chen, 2018).

2.5.1. *Aspergillus oryzae*

O género *Aspergillus* é um dos grandes fungos na deterioração alimentar, sendo que faz concorrência com as espécies de *Penicillium* e *Fusarium*. Apesar de *Aspergillus* não ter tanta variedade de espécies como *Penicillium*, este tem vantagem devido à sua capacidade de se multiplicar, ou no mínimo tolerar, altas temperaturas e/ou reduzida atividade da água. Este também se desenvolve mais depressa e, apesar de demorar mais tempo para esporular, produz esporos mais resistentes à luz e a compostos químicos (Pitt et al., 2009).



Figura 4 - *Aspergillus oryzae* (Hazzaa et al., 2013).

Aspergillus são, então, fungos multicelulares, caracterizados, em termos gerais, pela formação de conidióforos com grandes e pesados estipes e apícios, denominados de vesículas. As vesículas são, por norma, mais ou menos esféricas, podendo, em algumas espécies, ser alongadas. As vesículas suportam fiáides, podendo ou não também ter métulas, de onde saem os conídios.

Neste trabalho utilizou-se a espécie *Aspergillus oryzae* que é extremamente parecida com *Aspergillus flavus*, ao que se acredita que esta é uma forma domesticada da *A. flavus*, no entanto, ao contrário de *A. flavus*, *A. oryzae* não produz aflatoxinas, e foi obtido após séculos de uso na produção dos vários produtos fermentados. As colónias de *A. oryzae* possuem tanto fiáides como métulas e apresentam o conídio com uma cor branca, que fica amarelada com o continuo desenvolvimento, ficando depois verde e por fim um verde acastanhado. A sua temperatura ideal de crescimento é entre 32° - 36 °C (Barbesgaard et al., 1992; Pitt et al., 2009).

Aspergillus oryzae constitui a base de muitos dos alimentos fermentados na Ásia, como o molho de soja e o *miso*, que se obtêm da fermentação da soja, e o *sake* e o *amazake*, que se obtêm da fermentação do arroz. Estes produtos são produzidos utilizando *koji* (*rice koji* ou *tane koji*) que é, basicamente, *A. oryzae* criado em arroz cozido, contendo as enzimas necessárias para a hidrólise do amido e da proteína (Bamforth, 2005; Pitt et al., 2009).



Figura 5 - *koji* após 3 dias de desenvolvimento.

Sabe-se que *Aspergillus oryzae* possui uma grande variedade de enzimas hidrolíticas e uma forte capacidade de degradar diversos compostos, sendo que, o papel mais importante do *koji* é a hidrólise de compostos de alto polímero, como o amido, a proteína e a celulose.

Duas das enzimas mais estudadas, produzidas pelo *A. oryzae*, são a α -amilase e a glucoamilase, pois são essenciais à produção do *amazake*. Como a α -amilase é uma das enzimas mais importantes para a fermentação, *A. oryzae* evoluiu para ter três cópias de genes, isto deve-se à seleção de estirpes com elevada atividade amilolítica para preparação de *koji* à centenas de anos. *A. oryzae* tem dois tipos de glucoamilases, uma que é proeminente expressa em meios de cultura líquido (glaA) e outra expressa em cultura sólida (glaB), isto sugere que *A. oryzae* provavelmente contém genes especificamente expressos sob condições de cultura de estado sólido, como por exemplo, os genes que codificam tirosinase, protease ácida, hidrofobina. O pH do meio de cultura também representa um importante fator no desenvolvimento das enzimas. Outras enzimas de importância são a protease ácida, protease

neutra II e protease alcalina, proteínase, que têm o papel de degradar a proteína (Hata et al., 1998; Kitamoto, 2002; Machida et al., 2008).

2.5.2. Processos de produção de *amazake*

2.5.2.1. *Koji*

O primeiro passo para a produção de *amazake* é a produção de *koji*. Este processo começa com a lavagem do arroz e deixar a demolhar durante 24 horas. De seguida, ocorre a cozedura do arroz por vapor (entre a 30-60 minutos), deixando, depois, arrefecer. O arroz é, então, inoculado com *Aspergillus oryzae* e arrumado num tabuleiro de modo a formar uma camada fina e uniforme e vai ser mantido numa sala a, aproximadamente, 32 °C, onde fica até estar pronto.



Figura 6 - Preparação do *koji* em tabuleiros (South River Miso Company).

Durante este passo o *koji* é remexido, de modo a libertar o dióxido de carbono, dispersar o calor e o vapor de água, originado do metabolismo do fungo, e uniformizar a temperatura. Por volta de 2 dias após a inoculação, o *koji* já está pronto a ser utilizado (South River Miso Company).

2.5.2.2. Hidrólise enzimática do amido

Para produzir *amazake* começa-se por lavar o arroz e cozê-lo em água, durante, aproximadamente, 15 minutos. Depois de cozido, adiciona-se água até arrefecer para uma temperatura entre 50 °C e 60 °C, pois se a temperatura for muito alta diminui-se a viabilidade do fungo e das enzimas e se for muito baixa, hidrolisa demais, tornando a bebida azeda. Por fim, mistura-se o *koji* no arroz e deixa-se a essa temperatura, durante 8 a 10 horas. É necessário ir mexendo e controlar a temperatura do



Figura 7 - Mistura de *koji* no arroz para produção de *amazake* (Chen, 2018).

preparado até estar pronto e, posteriormente, deixar arrefecer. O *amazake* deve de ser mantido ou no frigorífico (máximo 1 semana) ou no congelador (máximo 1 mês) (Chen, 2018).

O gosto doce desta bebida provém do seu alto teor em glucose, que origina da hidrólise do amido. Esta hidrólise ocorre devido à presença do *koji*, que fornece as enzimas necessárias à fragmentação do amido, sendo as mais importantes as α -amilases, as β -amilases e as glucoamilases (Blanshard et al., 1979).

2.6. Propriedades Físico-químicas dos Alimentos

2.6.1. Perfil Nutricional

2.6.1.1. Cinza

A cinza de um alimento é o resíduo inorgânico que permanece após a queima da matéria orgânica, usando temperaturas à volta dos 550-570 °C. Ela é constituída principalmente por

macronutrientes, normalmente presentes em grandes quantidades, como o potássio (K), o sódio (Na), o cálcio (Ca) ou o fósforo (P), micronutrientes, geralmente presentes em pequenas quantidades nos alimentos, como o ferro (Fe), o cobre (Cu), o zinco (Zn), o manganês (Mn), entre outros, e elementos vestigiais. Alguns elementos vestigiais são necessários ao organismo, mas muitos deles são prejudiciais à saúde, como o crômio (Cr), o cobalto (Co) e o cádmio (Cd). A cinza é o ponto de partida para a análise de minerais específicos que são analisados tanto para fins nutricionais como para segurança. (Zenebon et al., 2008).

2.6.1.2. Lípidos

Os lípidos são compostos orgânicos que contêm ácidos essenciais ao organismo e atuam como transportadores de vitaminas lipossolúveis. Estes são insolúveis em água, mas são solúveis em solventes orgânicos, como por exemplo éter e acetona (Zenebon et al., 2008).

Os lípidos são normalmente determinados por métodos de extração com solventes, sendo um dos métodos mais usuais a extração contínua com um extrator Soxhlet, seguida por uma evaporação ou destilação para remover o solvente empregado. O processo começa com a colocação da amostra (envolta num filtro de papel)

no aparelho, de seguida, o solvente é colocado dentro do balão de destilação com uma quantidade superior à da amostra. Depois, o balão com o solvente é aquecido e o refluxo é proporcionado a partir do condensador, com o vapor a subir o frasco e a condensar na parte central do Soxhlet. A amostra absorve o solvente aos poucos e vai-se dissolvendo com o seu aquecimento e as partículas sólidas da substância são extraídas pelo tubo lateral do reservatório de vidro (Zenebon et al., 2008).

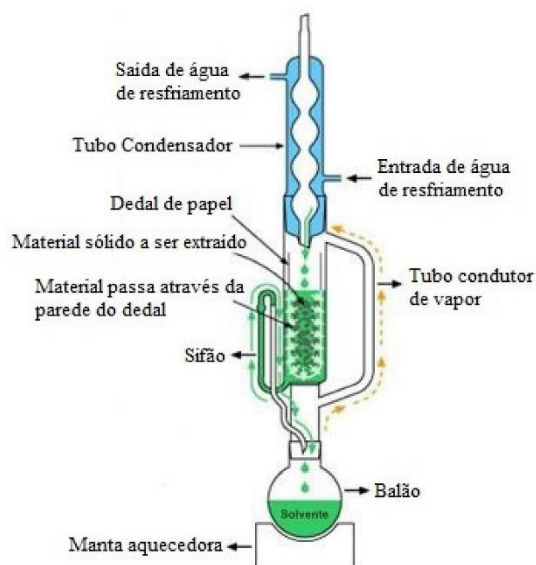


Figura 8 - Esquema de um sistema de extração Soxhlet (Costa et al., 2017).

2.6.1.3. Proteínas

As proteínas são polímeros de aminoácidos com funções biológicas e fisiológicas específicas nos organismos, tal como, biocatalizadores, estruturais, hormonais, de transporte, fonte de carbono e energia, entre outros. As proteínas têm a capacidade de interagir com a água, os lípidos e outros componentes, e podem alterar a textura e propriedades reológicas dos alimentos (Zenebon et al., 2008).

As proteínas são determinadas através da determinação do nitrogénio, normalmente pelo método Kjeldahl. Este divide-se em três fases, a digestão, a destilação e a titulação. Durante a digestão a matéria orgânica existente na amostra é decomposta por ácido sulfúrico e um

catalisador e o nitrogénio é transformado em sal amoniacal. Na destilação utiliza-se o hidróxido de sódio para libertar o amoníaco do sal amoniacal da amostra, o amoníaco vai, depois, reagir com um ácido adicionado (normalmente é utilizado um ácido fraco como o ácido bórico) e voltam a formar uma solução de sal amoniacal. Por fim realiza-se a titulação, onde se determina a quantidade de nitrogénio presente na solução titulando-a com um ácido forte, como o ácido clorídrico (Zenebon et al., 2008).

O método Kjeldahl permite-nos calcular a quantidade de nitrogénio total numa amostra, para calcular a quantidade de proteína tem de se ter em consideração o tipo de proteína presente na amostra e a sua percentagem em nitrogénio, assim, para o cálculo da proteína é necessário um fator de conversão. Existe um fator universal de 6,25 que é utilizado quando não existem outros fatores mais adequados para o produto a ser analisado (Zenebon et al., 2008).

2.6.1.4. Hidratos de Carbono

Os hidratos de carbono, são moléculas constituídas simples ou complexas, podendo formar desde monossacáridos a polissacáridos. Existem vários métodos para a determinação do conteúdo de uma amostra em glúcidos, sendo que estes se baseiam nas propriedades físicas das suas soluções ou no poder redutor dos glúcidos mais simples (obtendo-se de compostos mais complexos por hidrólise) (Zenebon et al., 2008).

Os métodos utilizados neste trabalho foram o método DNS, que é um método rápido e prático na determinação de açúcares redutores e baseia-se na redução do ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) pelos açúcares e o HPLC (cromatografia líquida de alta resolução), que permite a identificação e quantificação de compostos dissolvidos numa amostra líquida (Sequeira, 2012). O DNS é utilizado em conjunto com uma solução de tartarato de sódio e potássio, que vai prevenir a oxidação do ácido (Santos et al., 2017).

2.6.2. Atividade da água (a_w)

Uma propriedade importante para a previsão do comportamento microbiano num alimento é a atividade da água (a_w), este não vai ser igual à quantidade de água no produto, sendo que um produto com elevada percentagem em água pode ter tanto um a_w elevado como baixo. Esta vai, então, depender dos efeitos coligativos das substâncias dissolvidas na solução, por exemplo quanto maior a concentração do sal ou do açúcar, menor a atividade da água. Vai depender, também, dos efeitos capilares, onde a pressão do vapor de água é menor que a da água pura devido a mudanças nas ligações de hidrogénio entre as moléculas de água. Por fim, depende das interações superficiais da água com os compostos não dissolvidos, como por exemplo o amido ou as proteínas. A atividade da água é, também, dependente da temperatura, pois esta vai alterar as interações das moléculas da água com outras moléculas (Fontana, 2001).

A atividade da água é definida pela razão entre fugacidade da água, ou tendência da água para escapar do sistema (f), pela fugacidade da água pura (f_0). Na maioria das condições a fugacidade é próxima da pressão de vapor ($f \approx P$), logo a atividade de água é definida pela razão entre a pressão do vapor de água num material (P) com a pressão de vapor de água pura (P_0) à mesma temperatura, ou seja, $a_w = f / f_0 = P / P_0$ (Fontana, 2001).

A humidade relativa do ar é dada pela razão entre a pressão de vapor do ar e a pressão do vapor de saturação, assim, quando o vapor e a temperatura estão equilibrados a atividade da água vai ser igual à humidade relativa do ar (ERH) em redor da amostra numa câmara selada, calculada pela seguinte equação: $a_w = ERH / 100$ (Fontana, 2001).

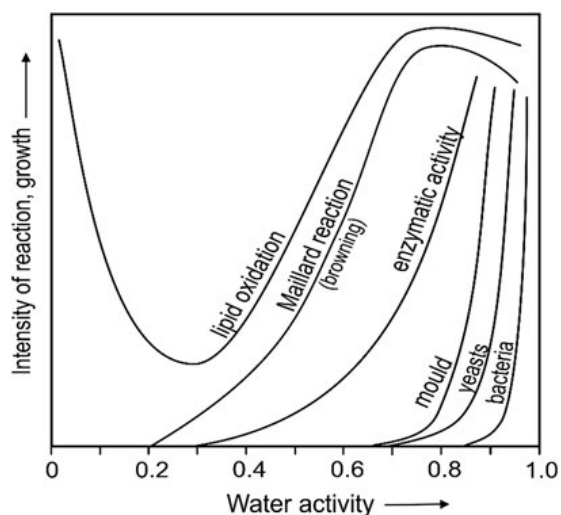


Figura 9 – Reações químicas e bioquímicas e crescimento microbiano em função da atividade da água (Lewandowski et al., 2018).

O a_w varia entre 0 e 1, considerando que o 1 corresponde à água pura e 0 a um alimento sem qualquer água livre, o que na prática não é possível. Pela Figura 9 pode-se ver que um produto é microbiologicamente estável para valores de a_w inferiores ou iguais a 0,6, visto que não se verifica crescimento microbiano, e para valores inferiores ou iguais a 0,3 é estável a nível enzimático, no entanto as reações de oxidação lipídica aumentam para valores muito baixos (Fontana, 2001; FSAI, 2019).

Controlar a atividade da água dos alimentos permite prever quais os microrganismos que poderão vir a ser um problema, manter a estabilidade química dos alimentos, minimizar as reações de escurecimento não enzimáticas e as reações espontâneas de oxidação lipídica, prolongar a atividade das enzimas e vitaminas e otimizar as propriedades físicas dos alimentos, tal como a textura e a *shelf life* (Fontana, 2001; FSAI, 2019).

2.6.3. Avaliação das propriedades dos alimentos

2.6.3.1. Avaliação da Textura

Os cinco principais fatores de qualidade dos alimentos são aparência, aroma, sabor, nutrição e textura, esta é caracterizada como a resposta dos sentidos táteis aos estímulos físicos que resultam do contacto entre o corpo e a comida. Na indústria alimentar a análise destes fatores é extremamente importante, sendo que, já se desenvolveu uma variedade de métodos para medir as diferentes propriedades sensoriais e texturais exibidas pelos vários alimentos (Bourne, 2002).

Neste trabalho vamos falar de TPA (*Texture Profile Analysis*), também denominado de teste de duas dentadas, onde ocorrem duas perfurações, penetração ou compressão, no alimento com um tempo de espera entre elas. Com este teste vai-se obter uma curva com força vs. tempo, parecida à representada na Figura 5Figura 10 (Bourne, 2002).

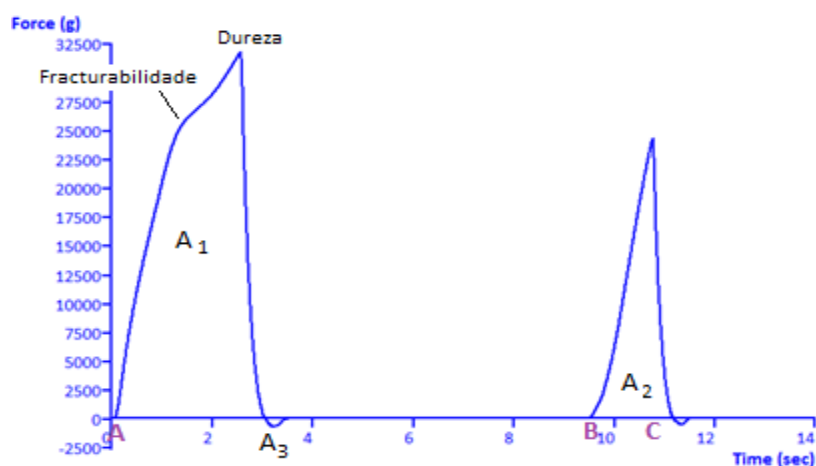


Figura 10 - Exemplo de uma curva obtida de um teste TPA realizada ao queijo cheddar (Texture Technologies).

Desta curva podemos obter várias informações. O ponto A é o início da primeira penetração ou compressão e o ponto B é o início da segunda. A força máxima do primeiro pico obtido indica a dureza, em alguns casos é a força necessária para partir a amostra, também pode estar associada à firmeza, que é a força máxima registada no gráfico. Na Figura 10 está representado, no primeiro pico, uma primeira quebra antes da força máxima, que representa a fracturabilidade. A razão entre o trabalho realizado na segunda penetração com o trabalho realizado na primeira penetração (A_2/A_1) é definido como coesividade. A área de força negativa na primeira penetração (A_3) representa o trabalho necessário para afastar a sonda da amostra, denominado de adesividade. Por fim, a altura que o alimento recuperou entre a primeira e a segunda penetração (intervalo de tempo entre o ponto B e C, sendo que C é o segundo em que se dá o segundo pico) é definida como elasticidade (Bourne, 2002).

2.6.3.2. Análise sensorial

A análise sensorial é uma técnica que se baseia em provas de teste onde certos indivíduos avaliam produtos alimentares de acordo com as suas propriedades sensoriais ou organoléticas. Estes testes são utilizados no desenvolvimento de novos produtos ou no controlo da qualidade, sendo que, são obtidos dados que depois são tratados estatisticamente, permitindo-nos perceber quais as suas características perceptíveis, se um produto difere de outro, se são muito diferentes, quais as consequências de uma modificação no processo ou se gostam do produto (Noronha, 2003).

Existem três tipos de testes sensoriais, testes discriminativos, que indicam se existe ou não diferenças entre as amostras analisadas, testes descritivos, onde se obtém uma descrição em

termos de grandeza sensorial de uma ou mais características do produto, e testes hedônicos ou afetivos, onde o provador indica a sua opinião subjetiva sobre o produto, estes são utilizados no desenvolvimento de produtos e na avaliação do potencial de mercado (Noronha, 2003).

3. Desenvolvimento Experimental

3.1. Microrganismos e matérias primas

Para este trabalho foi utilizado *Aspergillus oryzae* CBS 819.72. O fungo foi rotineiramente cultivado em placas meio YPD (*Yeast Extract–Peptone–Dextrose*) e incubado a 28 °C até crescimento visível com esporulação abundante e utilizado para a produção de *koji* usado na hidrólise do amido do arroz e trinca.

Em relação à matéria prima foi utilizado trinca de arroz carolino fornecido pela empresa Sollo e proveniente da região de Alcácer do Sal.

3.2. Produção de RRS

3.2.1. Preparação da matéria prima

As matérias primas (arroz carolino e trinca de arroz carolino) sofreram diferentes processamentos consoante se destinavam à produção de *koji* ou à produção de *amazake*.

Se eram destinados à produção de *koji*, hidratou-se a matéria prima durante 24 horas em água desmineralizada, numa proporção de 3 partes de água para 1 de matéria prima seca. Após hidratação fez-se um tratamento térmico, ou seja, deu-se uma cozedura a vapor, utilizando um robô de cozinha (*Bimby, Vorwerk*), durante 30 minutos, em porções de 500 g de arroz hidratado. Após cozedura a matéria prima foi guardada em sacos de plástico e conservada a -20 °C até ser utilizado.

O arroz carolino destinado à produção de *amazake* procedeu-se ao mesmo procedimento descrito anteriormente, com a diferença de que o período de tratamento foi de 1 hora e 30 minutos.

No caso da trinca de arroz carolino usada na produção de hidrolisado (*amazake*), após a hidratação, esta foi sujeita a uma cozedura por imersão em água, durante 10 minutos, a 100 °C, utilizando o cesto do equipamento. Após o tratamento térmico, drenou-se o excesso de água, guardou-se em sacos e foi conservada a -20 °C até ser necessário.

3.2.2. Produção de *koji*

O *koji* foi produzido a partir de arroz carolino ou trinca, processados de acordo com o processo descrito em 3.2.1.. A matéria prima foi, depois, disposta em tabuleiros perfurados, sobre uma gaze dupla, obtendo-se uma altura de 2,5 a 3 cm.

A partir de uma placa inoculada com *Aspergillus oryzae*, preparou-se uma suspensão de fungo em água desmineralizada estéril, de forma a obter 10^7 esporos/ml. Esta suspensão foi pulverizada na matéria prima de forma a garantir um inóculo inicial de 10^5 esporos/g de arroz.

A matéria prima foi coberta com uma gaze dupla e incubada à temperatura ambiente, em sistema aberto, até esporulação visível e abundante (entre 2 e 3 dias). Durante a incubação a camada de arroz foi periodicamente misturada, de forma a garantir o crescimento homogêneo do fungo e libertar vapor e calor resultantes do metabolismo do mesmo, para garantir uma boa distribuição de temperatura.

O *koji* foi guardado em sacos de plástico e conservado a -20 °C até ser utilizado.

3.2.3. Hidrólise enzimática (produção de *amazake*)

Para a produção de hidrolisado de arroz ou *amazake*, inoculou-se o arroz ou trinca, preparados de acordo com o processo descrito em 3.2.1., com 5,6 % de *koji* (g *koji* / g arroz). Homogeneizou-se a mistura e colocou-se em tinas de vidro (cristalizadores de vidro) e incubou-se em estufa durante um período de tempo predeterminado, em sistema fechado. Ao longo do tempo de incubação foram recolhidas amostras periodicamente, com aproximadamente 1,5 – 2 g e foram conservadas no frio até serem analisadas, usando os procedimentos descritos em 3.3.1. (quantificação do amido solúvel) e 3.3.2.1. (Quantificação dos açúcares redutores).

A produção otimizada e utilizada nos estudos subsequentes, corresponde às seguintes condições:

- 5,6 % de *koji* /arroz;
- Temperatura de 45 °C;
- Tempo de incubação de 15 horas.

3.2.4. Desidratação e Moagem

Após a hidrólise adicionou-se 100 mL de água desmineralizada por cada 1100 mL de *amazake* produzido a partir de arroz ou adicionou-se 50 mL de água no caso de hidrolisados produzidos a partir de trinca, de forma a obter uma estrutura mais fluida e pastosa.

O hidrolisado foi triturado utilizando um robô de cozinha (*Bimby*, *Vorwerk*) e passou-se a mistura num crivo de metal, de modo a remover as partes não trituradas e a obter uma pasta homogênea.

De seguida espalharam-se camadas finas da pasta em folhas antiaderentes, sobre os tabuleiros do desidratador (*Excalibur* 3900), pré-aquecido a 68 °C e deixou-se a desidratar durante um período de tempo entre 2 e 5 horas. Repetiu-se o mesmo processo, mas no forno, pré-aquecido a 135 °C e deixou-se entre 20 e 40 minutos.

Após a desidratação, as tiras com as características desejáveis (cor, sabor e teor de água) foram trituradas num moinho (FRITSCH Pulverisette 14) obtendo duas amostras finais do

River Rice Sugar[®], uma amostra é de adoçante com um diâmetro de 0,5 mm e a outra de adoçante com um diâmetro de 2 mm.

3.3. Análises físico-químicas

3.3.1. Quantificação do amido

A determinação da concentração de amido das amostras foi realizada com base no método Iodo/Iodeto de potássio, utilizando uma reta de calibração previamente preparada utilizando o mesmo método e soluções de amido com concentrações conhecidas.

O método baseou-se na preparação de 10 mL de uma solução de amido, adicionou-se 10 µL da solução de iodo/iodeto de potássio 0,01 M e procedeu-se à leitura de absorvância num espectrofotómetro UV-VIS (*Ultrospec 2100 pro*) a 610 nm.

Construiu-se uma reta de calibração para uma gama de concentração entre 0 e 50 mg/mL de amido (Anexo 7.2), tendo sido utilizada para quantificar a concentração de amido nas amostras retiradas ao longo do projeto. Esta análise foi realizada em duplicado, sendo que o resultado final corresponde à média das repetições.

3.3.2. Quantificação dos açúcares redutores

3.3.2.1. Método DNS

A quantificação dos açúcares redutores nas amostras foi realizada pelo método DNS, com base numa reta de calibração com diferentes concentrações de maltose, entre 0 e 2000 µg/mL (Anexo 7.3).

Recolheram-se 2 mL de solução a quantificar e adicionou-se 1 mL de solução corante (tartarato de sódio e potássio 2,65 M, ácido 3,5-Dinitrosalicílico 96 mM em NaOH 2M). De seguida, incubou-se as amostras a analisar 15 minutos a 100 °C, arrefeceu-se em gelo, adicionou-se 9 mL de água desmineralizada e leu-se a absorvância num espectrofotómetro UV-VIS (*Ultrospec 2100 pro*) a 540 nm.

Esta análise foi realizada em duplicado, sendo que o resultado final corresponde à média das repetições.

3.3.2.2. Análise por HPLC

A quantificação mais precisa e discriminativa dos açúcares das amostras de RRS foi realizada por HPLC (cromatografia líquida de elevada eficiência), utilizando uma bomba *Waters 515*, um injetor *Waters U6K*, um detetor de índice de refração *Waters 2414*, uma coluna *polyspher CACC* (6 mm), H₂SO₄ de 5 mM como eluente, um fluxo de 0,50 mL/min, uma temperatura do forno de 50 °C, um volume de amostra injetado de 10,0 µL e um tempo de corrida de 30 minutos.

Utilizou-se uma solução de H₂SO₄ de 5 mM previamente desgaseificada e filtrada, com um filtro de 0,02 µm de diâmetro do poro.

Prepararam-se retas de calibração com soluções de concentração conhecidas de glucose (entre 1 g/L e 20 g/L), maltose (entre 1 g/L e 60 g/L) e maltotriose (entre 1 g/L e 20 g/L) e construiu-se os respetivos gráficos (área vs. concentração (g/L)) (Anexo 7.4). Assim, vamos obter a concentração dos diferentes compostos através da área dos picos obtidos no HPLC.

No caso das amostras de RRS analisadas, estas foram previamente tratadas. Diluiu-se 1 g de cada amostra em 10 mL de água Milli-Q, agitou-se no vortex durante 1 minuto, transferiu-se 1,5 mL para um tubo eppendorf e centrifugou-se durante 10 minutos, a 15294*g. Depois, recolheu-se 1 mL do sobrenadante para outro tubo eppendorf e adicionou-se 30 µL de ácido perclórico (70 %). De seguida, colocou-se o tubo em gelo durante 30 minutos. Voltou-se a centrifugar o tubo durante 10 min, a 15294*g. Por fim, retirou-se 750 µL do sobrenadante para outro tubo eppendorf e filtrou-se a amostra, utilizando filtros de 0,22 µm, para um tubo e manteve-se no frigorífico para depois se realizar o HPLC. Esta análise foi realizada em duplicado, sendo que o resultado final corresponde à média das repetições.

3.3.3. Quantificação da proteína

3.3.3.1. Quantificação de proteína solúvel: Método de Bradford

A proteína solúvel foi determinada utilizando o método de Bradford. Resumidamente, adicionou-se um volume igual de amostra e de reagente de Bradford (Sigma) e realizou-se a leitura da absorvância a 595 nm num espectrofotómetro (*Ultrospec 2100 pro*).

Construiu-se uma reta de calibração utilizando soluções padrão de caseína, entre 0 e 20 µg/mL (Anexo 7.1), sujeitas ao mesmo procedimento.

Esta análise foi realizada em duplicado, sendo que o resultado final corresponde à média das repetições.

3.3.3.2. Quantificação de proteína total: Método Kjeldahl

Para determinar a composição nutricional do RRS em proteína utilizou-se o método Kjeldahl descrito na ISO 20483:2006 que se baseia em três etapas: digestão, destilação e titulação.

Primeiro pesou-se cerca de 5 g de amostra (com uma precisão de 0,001 g) e colocou-se num balão Kjeldahl. Depois adicionou-se 25 mL de ácido sulfúrico e duas pastilhas catalisadoras ao balão com a amostra e a um balão vazio (branco) e misturou-se até toda a amostra estar em contacto com o ácido. De seguida, aqueceu-se a unidade de digestão até à temperatura 420±10 °C, colocou-se os balões de Kjeldahl e deixou-se a digerir entre duas horas a duas horas e meia.

Após a digestão, deixou-se arrefecer os balões e colocou-se nos balões Kjeldahl 4 gotas de fenolftaleína 0,1 % e 4 gotas do indicador colorimétrico em balões Erlenmeyer. De seguida, colocou-se o tubo e o Erlenmeyer nas suas respetivas posições na unidade de destilação Kjeldahl (UDK 159) e destilou-se com as seguintes condições de teste: 50 mL de água, 30 mL de ácido bórico e 80 mL de hidróxido de sódio, durante 3 minutos.

Por fim, titulou-se a solução que ficou no Erlenmeyer com ácido clorídrico 0,1 M até esta alterar a sua cor verde para cor de rosa. Para calcular a quantidade de proteína utilizou-se a seguinte equação:

$$\% \text{ de Proteína} = \frac{(V - V_b) * 0,14}{M} * F$$

Onde M representa a massa pesada para a amostra, V é o volume de ácido clorídrico utilizado para a titulação da amostra, V_b é o volume de ácido clorídrico gasto na titulação do branco, 0,14 é o equivalente-grama para o nitrogénio e F representa o fator de conversão utilizado, o fator universal é de 6,25, mas neste trabalho utilizou-se o fator para o arroz de 5,95.

Efetuuou-se o ensaio em triplicado, sendo que o resultado final corresponde à média das repetições, tendo em consideração os respetivos desvios padrões e os erros associados.

3.3.4. Quantificação dos lípidos

Para a análise das gorduras foi utilizada a norma portuguesa NP4168 de 1991. Esta análise foi realizada em triplicado.

Primeiro pesou-se num balão Erlenmeyer cerca de 4 g de amostra. Depois adicionou-se 10 mL de Etanol (95 %) e homogeneizou-se, de seguida adicionou-se 8 mL de ácido fórmico e 12 mL ácido clorídrico (70 %) e voltou-se a homogeneizar. Instalou-se um condensador no Erlenmeyer e aqueceu-se o balão para uma temperatura de 75 °C, durante 30 minutos. No final, deixou-se arrefecer o Erlenmeyer.

Após estar arrefecido, filtrou-se o conteúdo do balão. O filtro, que reteve a amostra, foi limpo com água destilada, de modo a que o pH ficasse, aproximadamente, 7. Este foi, depois, colocado numa estufa a secar e, de seguida, foi colocado num balão (previamente pesado). Adicionou-se ao balão, com o filtro, 250 mL do solvente (hexano) e este foi colocado no extrator Soxhlet durante 4 horas. Por último, deixou-se arrefecer o balão e evaporou-se o solvente e, finalmente, pesou-se o balão.

O cálculo da percentagem de gordura baseou-se na seguinte equação:

$$\text{Gordura (\%)} = 100 * \frac{B - P}{A}$$

Onde, A equivale à massa da amostra, B representa a massa do balão e P é a massa final do balão com a gordura.

3.3.5. Quantificação das cinzas

Para análise das cinzas colocou-se uma cápsula na mufla a 550 °C, durante 10 horas, para eliminar possíveis impurezas e, após retirar a cápsula da mufla, deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente num exsiccador e pesou-se, de modo a obter a tara da cápsula.

De seguida, pesou-se, aproximadamente, 1 g de amostra e colocou-se na cápsula. Colocou-se a cápsula com a amostra na mufla, previamente aquecida até 550 °C, e incubou-se até a amostra apresentar uma cor branca ou ligeiramente acinzentada. Retirou-se da mufla e colocou-se num exsiccador, deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente e pesou-se.

O valor de percentagem de cinzas (peso/peso de amostra) foi calculado com base na expressão:

$$\text{Cinza (\%)} = \frac{100 * C}{P}$$

Onde P equivale à massa da amostra antes de se colocar na mufla (massa da cápsula com a amostra antes da mufla – massa da cápsula) e C equivale à massa das cinzas (massa da cápsula com amostra após a mufla – massa da cápsula).

Efetou-se o ensaio em triplicado, sendo que o resultado final corresponde à média das repetições, tendo em consideração os respetivos desvios padrões e os erros associados.

3.3.6. Determinação da atividade de água

De modo a obter o a_w do RRS foi utilizado um aparelho medidor de a_w (*HygroLab, Rotronic*). Para tal colocou-se um pouco da amostra num recipiente, o suficiente para cobrir o fundo do recipiente, e após, aproximadamente, 5 minutos obteve-se o valor.

Esta análise foi realizada em duplicado, sendo que o resultado final corresponde à média das repetições, tendo em consideração os respetivos desvios padrões e os erros associados.

3.4. Análise de atividade enzimática

3.4.1. Obtenção de extrato enzimático

Preparou-se um extrato enzimático para estudar a atividade proteolítica e amilolítica das enzimas do fungo, de modo a determinar a temperatura ideal para a produção de *amazake*.

Para tal, após um crescimento em placa durante 3 dias, transferiu-se a cultura de *Aspergillus oryzae* da placa para um meio líquido de cultura YP com amido (*Yeast Extract–Peptone*), tendo sido mantidos numa estufa com agitação a uma temperatura de 28 °C, durante 6 dias. Devido ao seu grande crescimento foi necessário refrescar o fungo.

No fim separou-se o sobrenadante do fungo através de processos de centrifugação a 18500* g, durante 15 minutos e de filtração usando uma membrana de 47 mm. Sendo que as análises para calcular a atividade proteolítica e amilolítica foram realizadas utilizando as enzimas presentes no sobrenadante.

3.4.2. Atividade proteolítica

Preparam-se diluições do sobrenadante, entre 1:10, 1:50, 1:100 e 1:1000, que foram depois testadas sobre uma solução de caseína de concentração conhecida (100 µg/mL), a fim de determinar a capacidade proteolítica das enzimas extracelulares produzidas por *Aspergillus oryzae*. Para tal, termoslizaram-se as amostras do sobrenadante diluídas (1,8 mL), adicionou-se a solução de caseína (0,2 mL) e incubou-se à mesma temperatura, retirando amostras ao tempo 0, 2, 5 e 10 minutos.

As amostras retiradas foram analisadas pelo método de Bradford, descrito em 3.3.3.1.

3.4.3. Atividade amilolítica

Para se estudar a atividade amilolítica do sobrenadante, foi necessário fazer dois testes, um para saber a concentração de amido solúvel presente nas amostras e outro para a concentração de açúcares redutores.

Preparam-se diluições do sobrenadante, entre 1:10, 1:50, 1:100 e 1:1000.

Incubou-se as amostras do sobrenadante a uma temperatura predefinida, adicionou-se a solução de amido 1 % numa proporção de 1:9 (1 mL de solução de amido para 9 mL de amostra) e incubou-se à mesma temperatura, retirando amostras ao tempo 0, 2, 5 e 10 minutos.

As amostras retiradas foram analisadas pelos métodos descritos em 3.3.1. (quantificação do amido) e 3.3.2.1. (quantificação dos açúcares redutores).

3.5. Desenvolvimento de produtos/aplicações

De forma a estudar possíveis aplicações para o RRS, como substituto do açúcar testaram-se as seguintes aplicações:

3.5.1. Adoçante de solução aquosa

Primeiro, adicionou-se 1 g de RRS (0,5 mm) em 30 mL de água fria, misturou-se durante 10 segundos, deixou-se repousar e observou-se.

Depois, experimentou-se dissolver 1 g de cada uma das granulometrias de RRS (0,5 mm e 2 mm) em café solúvel (Pingo Doce) a 90 °C. Para tal, preparou-se o café, dissolvendo 2 g de café em pó em 120 mL de água a 100 °C e repetiu-se o procedimento descrito anteriormente.

3.5.2. Adoçante em iogurte

Adicionou-se 5 g de RRS (0,5 mm) a 60 g de um iogurte natural (Pingo Doce) e comparou-se o resultado com uma amostra do mesmo iogurte com 5 g de sacarose.

3.5.3. Adoçante em pudins e geleias

Preparou-se um pudim instantâneo (Mandarim) utilizando 1,2 g do preparado, 15 g de RRS (0,5 mm) e 125 mL de leite, de acordo com as indicações. Comparou-se com um pudim preparado da mesma forma, mas usando sacarose.

Também se preparou uma geleia de frutas silvestres, fervendo 114 g de frutas silvestres congeladas (Pingo Doce) com 25 g de RRS, até se obter uma consistência de geleia. Comparou-se com outra geleia preparada da mesma forma, mas com sacarose.

3.5.4. Adoçante em bolachas

Preparam-se bolachas, misturando-se 27 g de farinha, 12 g de RRS, 8 g de água, 7 g de margarina e 0,5 g de fermento. Comparou-se com outras bolachas preparadas da mesma forma, mas com sacarose.

3.6. Análise Sensorial

3.6.1. Perfil de textura

A análise de textura foi realizada com o auxílio de um texturómetro (*Stable Micro Systems – Texture Analyser; TA – XT plus*), com uma célula de carga de 5 kg.

Ambas as análises foram efetuadas com testes TPA de penetração e utilizou-se uma sonda de alumínio com 2 mm de diâmetro, uma velocidade de penetração de 1 mm/s, profundidade de 3 mm e uma temperatura ambiente de 20 ± 5 °C.

Obteve-se uma curva com a força vs. tempo (a força é expressa em N e o tempo em s), a partir do qual se pode obter a firmeza (expressa em N), a adesividade (expressa em N.s) e a coesividade (adimensional), que se obtém calculando a razão do trabalho realizado na segunda penetração (A_2) pelo trabalho realizado na primeira penetração (A_1).

Em cada teste realizaram-se 3 repetições, assim sendo, os resultados obtidos correspondem à média destas repetições, tendo em conta os respetivos desvios padrão e erros associados.

3.6.2. Provas afetivas

Esta análise teve como objetivo perceber se os produtos produzidos com este adoçante seriam do agrado dos provadores, de modo a avaliar o seu potencial de mercado.

Foi realizado uma prova afetiva de aceitação ao iogurte com RRS, ao pudim mandarim com açúcar e ao com RRS e às bolachas com açúcar e RRS. O painel de provadores foi constituído

por 26 pessoas, com idades entre os 20 e os 64 anos, sendo que a faixa etária predominante é entre os 20 e os 30 anos (Anexo 7.5).

3.7. Tratamento estatístico

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa Microsoft Excel.

A análise de variância (ANOVA) foi efetuada para o nível de significância de 5 % ($\alpha=0,05$) de maneira a saber se as médias dos valores obtidos para as diferentes amostras diferem significativamente. Isto verifica-se sempre que o valor de p é inferior ao nível de significância (0,05) ou se o valor de F é superior ao valor do F crítico.

3.8. Avaliação do custo e rendimento de produção

O cálculo dos custos foi realizado, tendo em consideração as quantidades e os custos das matérias primas utilizadas, o preço para o consumo de energia nas indústrias e o consumo energético dos equipamentos utilizados no laboratório.

O cálculo do custo de utilização dos vários equipamentos para a produção de *Koji* e de RRS foi realizada calculando a energia gasta pelos diversos aparelhos (Energia = Potência * Tempo de utilização) e multiplicando a energia elétrica consumida pelo preço do seu consumo para as indústrias. Como os valores neste trabalho são para a utilização de 500 g de trinca, dividiram-se os valores obtidos no cálculo por 0,5 kg, de modo a obter um custo para a produção de RRS por kg de trinca (€/kg). Para a estufa, dado a sua dimensão maior, não foi necessário considerar por kg de trinca.

4. Resultados e Discussão,

4.1. Otimização do processo de produção do RRS

Numa primeira abordagem à produção de RRS foi necessário estudar a atividade enzimática do fungo e otimizar as condições de tempo e temperatura ideais para a hidrólise do amido e o processo de desidratação.

4.1.1. Otimização da variável temperatura em relação à atividade enzimática

De modo a determinar qual a temperatura mais adequada para o processo de hidrólise do amido do arroz, efetuaram-se testes preliminares com sobrenadantes obtidos após o cultivo de *Aspergillus oryzae*.

Para tal, determinou-se a quantidade de proteína solúvel presente nas amostras diluídas, de forma a garantir que o valor obtido se encontrava nos valores da reta de calibração (Anexo 7.1), tendo-se obtido os resultados na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentração de proteína presente no sobrenadante obtido do *Aspergillus oryzae*, com diferentes diluições.

	Proteína (µg/ml)		Média (proteína) (µg/ml)
Amostra (1:10)	17,92	18,54	18,23
Amostra (1:50)	13,62	13,10	13,36
Amostra (1:100)	1,34	4,68	3,01
Amostra (1:1000)	0,00	0,00	0,00

Em relação ao amido e aos açúcares redutores, necessários para a determinação da atividade amilolítica, procedeu-se da mesma forma, de modo a garantir que os valores obtidos se encontravam dentro dos valores das respetivas retas de calibração (Anexo 7.2 e Anexo 7.3).

A partir da análise dos valores apresentados na Tabela 3, foi possível concluir que a diluição 1:50 do sobrenadante foi a mais adequada aos estudos da atividade amilolítica e proteolítica da *Aspergillus oryzae*, e corresponde a uma concentração de proteína solúvel de 13,36 µg de proteína / ml de sobrenadante.

Após a realização destes ensaios, realizaram-se testes para a determinação da temperatura de hidrólise de amido e de proteína. Para tal, testaram-se para a diluição 1:50 do sobrenadante, diferentes temperaturas entre os 30 °C e os 50 °C, determinando a concentração de amido e de açúcares redutores ao fim de um curto intervalo de tempo, de forma a obter valores o mais aproximados da atividade enzimática máxima. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.

Na Tabela 4 **Erro! Autorreferência de marcador inválida.**, observa-se uma maior descida da concentração de amido nas temperaturas de 45 °C e 50 °C, sendo que, após 5 minutos, a concentração passa de 22,89 mg/mL para 6,55 mg/mL e 6,10 mg/mL, respetivamente. Enquanto para as temperaturas de 30 °C e 37 °C têm-se, respetivamente, uma concentração de 13,46 mg/mL e 9.95 mg/mL. O mesmo se continua a observar após 10 minutos.

Tabela 4 - Concentração de amido e de glucose presentes na solução com o sobrenadante com uma diluição de 1:50, obtidas nos vários tempos e temperaturas da análise e a respetiva atividade da amilase calculada.

Temp. (°C)	Tempo (min)	concentração de amido (mg/ml)	Concentração de glucose (µg/ml)	Atividade amilolítica
-	0	22,89	0,00	-
30	2	10,17	29,26	0,48
	5	13,46	35,12	0,14
37	2	10,50	28,46	0,46
	5	9,95	26,54	0,19
	10	8,80	32,94	0,11
45	5	6,55	24,99	0,24
	10	3,73	24,40	0,14
	15	4,11	26,48	0,09
50	5	6,10	34,96	0,25
	10	4,86	38,86	0,13
	15	5,04	37,42	0,09

Quanto à atividade proteolítica, observou-se que não existem grandes diferenças entre os resultados a 45 °C e 50 °C, após 10 minutos, sendo que se pode concluir que há uma baixa atividade proteolítica (Tabela 5).

Tabela 5 - Concentração de proteína na solução às várias temperaturas, após 2, 5 e 10 minutos.

	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração de Proteína (µg/ml)
Branco	-	0	0,00
Amostra 1:50	45	0	17,18
		2	20,11
		5	19,76
	50	10	19,06
		2	17,88
		5	18,32
		10	19,02

Pode-se, então, concluir que as temperaturas ideais para a produção do hidrolisado de arroz são os 45 °C e os 50 °C, uma vez que para estas temperaturas se obteve uma elevada atividade amilolítica sem que esta seja acompanhada por atividade proteolítica significativa. Estes resultados vão ao encontro dos resultados obtidos para a caracterização da α -amilase de *A. oryzae* (Chang et al., 1995; More et al., 2012), que oferece como temperatura ideal para

a α -amilase os 45 °C, mas difere dos resultados obtidos para a caracterização da glucoamilase (Nagashima et al., 1995; Hata et al., 1997), que refere os 60 °C - 65 °C como temperatura ótima. Chang et al. (1995) refere, ainda, que a 50 °C se observa alguma hidrólise da proteína e que a temperatura ótima vai depender de outros fatores como o tempo de hidrólise e o pH.

4.1.2. Otimização das condições de hidrólise do arroz

Após estabelecer a temperatura ótima de incubação entre 45 °C e 50 °C, realizaram-se testes para otimizar as condições de hidrólise do amido do arroz carolino.

O primeiro parâmetro testado foi novamente a temperatura, para confirmar que a gama escolhida correspondia à temperatura adequada para a produção de *amazake*. Outro parâmetro a otimizar foi o tempo de incubação. Desta forma, realizaram-se hidrólises de arroz cozido a vapor (ver 3.2.3.) nas duas temperaturas, 45 °C e 50 °C e determinou-se a concentração de glucose final ao fim de 5 h, 6 h e 15 h (Tabela 6).

Atendendo aos resultados obtidos foi possível verificar que a temperatura de 45 °C permitiu obter maiores teores de glucose e também se verificou que a concentração de glucose aumenta progressivamente até às 15 h (144,41 mg/g às 15 horas em comparação com 59 mg/g após 5 h de incubação a 45 °C). O menor valor de glucose a 50 °C reflete uma possível degradação proteica já referida por More et al. (2012).

Tabela 6 - Concentração de glucose nos amazakes produzidos com arroz cozido durante 1h30 a 45 °C e a 50 °C, após 5, 6 e 15,5 horas. No âmbito da otimização da fermentação.

	45 °C			50 °C		
	5 h	6 h	15 h	5 h	6 h	15 h
Concentração de glucose (mg/g)	59,00	80,43	144,41	31,10	46,90	130,88

Desta forma estabeleceu-se para os ensaios seguintes a temperatura de 45 °C, dado que não só permitiu obter maiores teores de glucose como é uma temperatura mais baixa logo vai implicar menores gastos energéticos.

Após os ensaios com o arroz, realizaram-se ensaios de otimização utilizando a trinca de arroz carolino cozido a vapor e submerso (ver 3.2.1.), a uma temperatura de 45 °C.

Na produção de *amazake* com a trinca, observou-se uma descida na concentração de açúcar comparativamente ao teor obtido com o arroz carolino inteiro, tendo-se obtido uma média de 53 mg/g de açúcar com a trinca (Tabela 7) contra os 144 mg/g (Tabela 6). Estes resultados não eram esperados, sendo que, previa-se que o menor tamanho e o maior grau de quebra levariam a uma maior disponibilidade do amido para as enzimas e consequentemente num

maior grau de hidrólise e concentração de glucose, tal como se observa no estudo feito por Aderemi et al. (2008).

Tabela 7 - Concentração de glucose nos amazakes produzidos com trinca cozida durante 1h30, a 45 °C. No âmbito da otimização da fermentação.

Amostra	Tempo (h)	Concentração de glucose (mg/g)	Média da concentração
Am_trinca_1 (1h30)	15	34,22	52,99
Am_trinca_2 (1h30)	15	64,38	
Am_trinca_3 (1h30)	15	78,38	
Am_trinca_5 (1h30)	15	34,99	

Dado este resultado, fez-se um outro ensaio em que foi utilizado trinca cozida por imersão em água durante 10 e 20 minutos, recolhendo-se amostras ao longo do tempo de incubação a 45 °C (Figura 11).

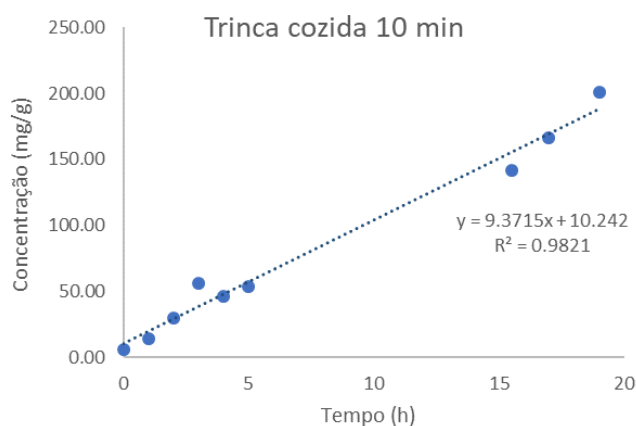


Figura 11 - Concentração de glucose nos amazakes produzidos com trinca cozida durante 10 minutos, a 45 °C. No âmbito da otimização da fermentação.

Os resultados obtidos permitiram observar um aumento linear da concentração de glucose ao longo do tempo de incubação. No caso do ensaio a trinca de arroz cozida durante 20 minutos verificou-se que o *amazake* apresentava uma concentração de glucose mais elevada desde o início até ao final da incubação, no entanto, ao final de 15 horas, este apresentava um travo azedo e a fungo, provavelmente resultante de metabolitos produzidos durante a hidrólise.

Estabeleceu-se, assim, as seguintes condições finais:

- Temperatura: 45 °C;
- Trinca de arroz cozida por imersão em água, durante 10 minutos;
- Tempo de incubação: 15 h.

4.1.3. Otimização da desidratação

Uma vez que se pretende obter um produto seco, de modo a ser mais fácil de conservar e manipular, realizou-se um passo de secagem que foi também necessário otimizar.

Este processo consiste na remoção da humidade, sendo que, o desenvolvimento de microrganismos ficará inibido e retarda a oxidação enzimática e lípica. Por outro lado, este processo provoca alterações nas propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos, resultando na perda de alguns compostos aromáticos e vitaminas (Harrison et al., 2000; Rahman, 2007).

Foram testadas, para o *amazake* produzido a partir de arroz e de trinca, duas condições de temperatura: uma maior temperatura (forno elétrico a 135 °C) e uma menor temperatura (desidratador a 68 °C), e diferentes tempos de desidratação. Os resultados para o *amazake* de arroz estão apresentados na Figura 12 e na Figura 13.

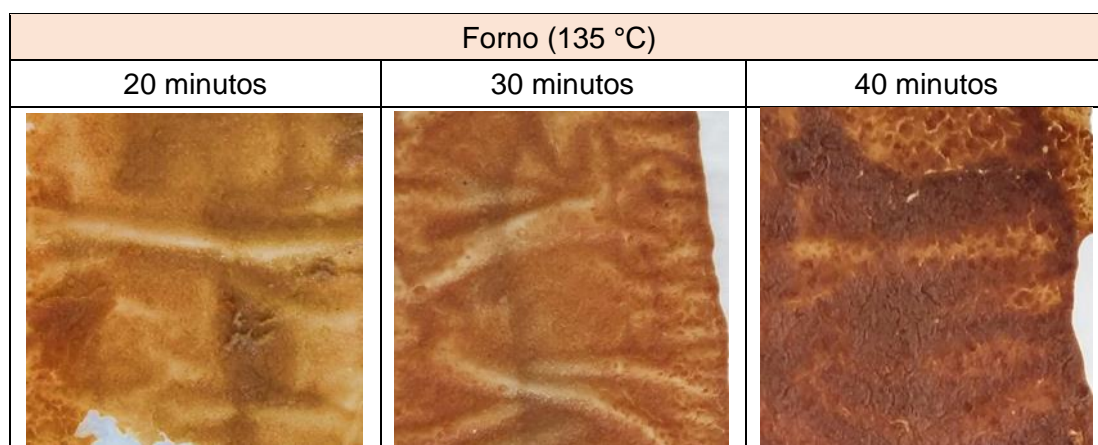


Figura 12 – Secagem realizada no forno, a uma temperatura de 135 °C, durante 20, 30 e 40 minutos.

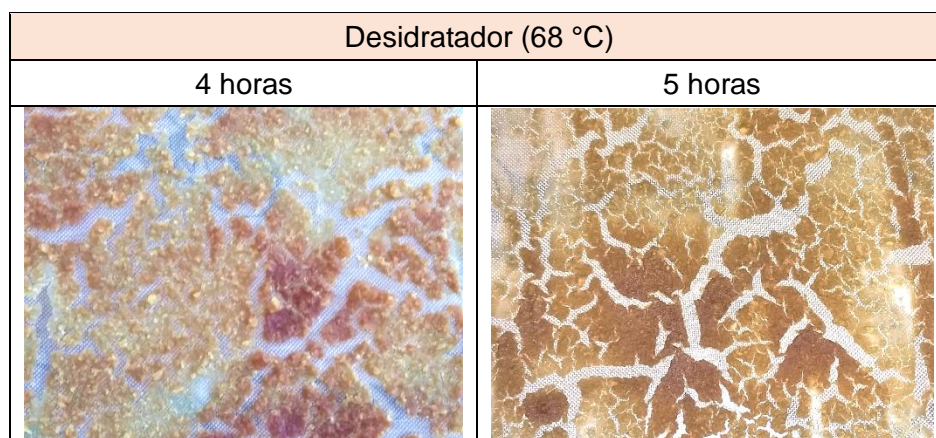


Figura 13 - Secagem realizada no desidratador, a uma temperatura de 68 °C, durante 4 e 5 horas.

No caso do *amazake* desidratado no forno observou-se que as tiras colocadas no forno não secavam por completo, ficando um pouco húmidas e aos 40 minutos eles ficavam, não só, húmidas como, também, demasiado queimadas (Figura 12). Uma vez que o objetivo era obter um produto seco, com uma *shelf life* longa, sem desenvolvimento microbiano e, também, como o produto final é moído, as amostras têm de apresentar baixa humidade para que não caramelizem no moinho, devido às altas temperaturas do processo, razão pela qual se optou pelo desidratador e não pelo forno.



Figura 14 - Tira de RRS, feita a partir de amazake de trinca, desidratada a 68 °C, durante 2h30m.

No caso do *amazake* desidratado no desidratador, após 3 horas as amostras ainda estavam húmidas, em certas partes. Após 4 horas todas as tiras apresentavam uma boa coloração e secura, mas algumas ainda estavam húmidas. Por fim, após 5 horas, elas estavam secas, mas queimadas (Figura 13).

Com a utilização da trinca cozida em água, o tempo de desidratação baixou para uma média de 2 horas e meia de secagem (Figura 14).

4.2. Caracterização do RRS

4.2.1. Perfil Nutricional

Uma vez que se pretende obter um produto destinado ao consumo humano foi necessário determinar o perfil nutricional do RRS (Tabela 8).

Pela Tabela 8 verifica-se que o RRS apresentou uma elevada percentagem de açúcares, sendo que a glucose é o açúcar com maior concentração, seguido da maltose e da maltotriose. Este resultado reflete a ação das enzimas produzidas por *Aspergillus oryzae* e as condições de incubação, uma vez que o fungo produz α -amilase, que corta aleatoriamente na cadeia do amido originando glucose, maltose e maltotriose, e glucoamilase que origina glucose.

Tabela 8 - Perfil nutricional do RRS.

Informação nutricional (g/100 g de RRS)	
Hidratos de Carbono	41,5
Glucose	64 %
Maltose	21,5 %
Maltotriose	14,5 %
Proteínas	6,75
Gorduras	1,47
Cinzas	0,34

A Tabela 8 apresenta apenas cerca de 50 % da composição nutricional do RRS e prevê-se que os restantes 50 % sejam maioritariamente fibras, devido ao elevado poder estruturante do RRS, e, em menor quantidade, vitaminas, pois observou-se no gráfico obtido do HPLC a presença de outros compostos, que não foi possível identificar, mas propõe-se que o ácido kójico seja um deles, pois este é bastante reportado como um dos metabolitos secundários do *Aspergillus oryzae* (Barbesgaard et al., 1992; Blumenthal, 2004).

Outra propriedade a ser analisada foi a atividade da água, onde um produto alimentar é considerado estável a nível microbiológico se o seu a_w for inferior ou igual a 0,6, como para o RRS se obteve um a_w de 0,339, conclui-se, então, que não há probabilidade de desenvolvimento microbiano (Fontana, 2001).

Comparando com o açúcar de coco (Trinidad et al., 2015), que é composto por 1,1 g de proteína, 0,1 g de gordura, 2,2 g de cinza e 94,5 g de Hidratos de carbono, onde foram identificados a sacarose, a frutose, a glucose e a manose, predominando a sacarose ($\approx 80\%$), podemos observar que o RRS tem uma constituição muito diferente, a quantidade de hidratos de carbono é quase metade da do açúcar de coco, com diferentes glúcidos, e apresenta maiores quantidades de proteína e de gordura.

4.2.2. Avaliação das aplicações do RRS

4.2.2.1. Perfil de textura

Quando se realizaram os ensaios sobre a aplicação do RRS com geleias e pudim instantâneo, verificou-se que havia uma alteração da textura do alimento, ficando mais espesso nos produtos com incorporação de RRS, o que poderia constituir uma vantagem para a sua utilização. Desta forma, considerou-se fazer uma análise de textura, obtendo-se gráficos de força (N) em função do tempo (s), a partir destes gráficos calcularam-se os parâmetros adesividade, firmeza e coesividade (Figura 15).

Pelos valores obtidos para a firmeza podemos concluir que é necessário aplicar uma força maior para “mastigar” a geleia com açúcar (1,099 N) do que a geleia com RRS (0,754 N), ou seja, esta tem uma textura mais rígida. O mesmo se verifica no pudim, sendo necessário uma força de 1,053 N para o pudim com açúcar e 0,616 N para o pudim com RRS.

Relativamente à adesividade, a geleia e o pudim com RRS apresentam o maior valor, 1,503 N.s e 1,246 N.s respetivamente, isto significa que, é preciso realizar mais trabalho para retirar a sonda da amostra.

A coesividade é um parâmetro relacionado com as forças exercidas pelas ligações da estrutura dos alimentos, assim, quanto mais coesas forem estas ligações, maior será o valor de coesividade. Pelos resultados obtidos, os produtos com RRS apresentam uma maior

coesividade (0,498 para a geleia e 0,376 para o pudim) que os produtos com açúcar (0,281 para a geleia e 0,245 para o pudim).

Em relação ao pudim, estas características são boas, considerando que, sensorialmente, apresentam uma textura mais cremosa e mais próxima da textura dos pudins caseiros, como se pode comprovar com o estudo realizado por Qasem et al. (2017), onde o pudim de controlo obteve 0.611 N de firmeza, 1,90 N.s de adesividade e 0,91 de coesividade.

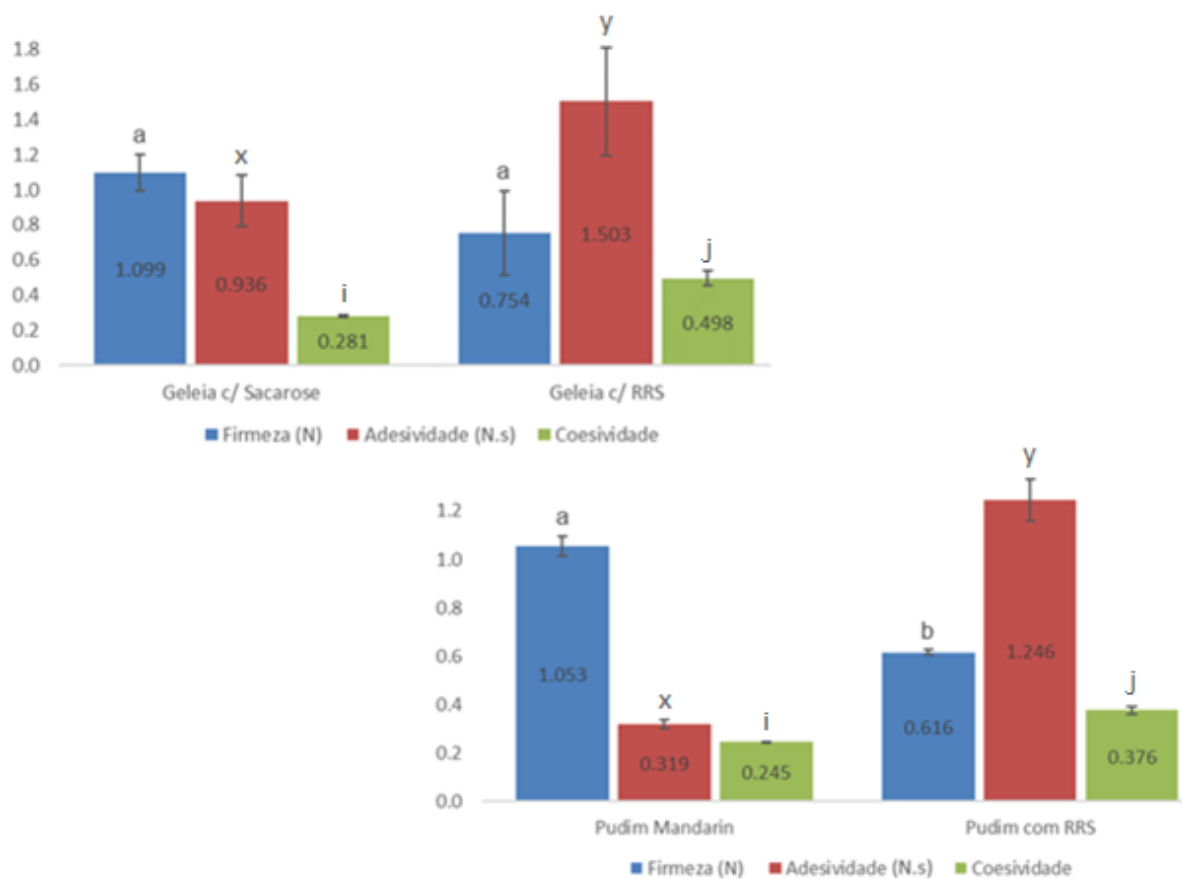


Figura 15 - Resultados do teste de TPA para a geleia, com sacarose e com RRS, e para o pudim, com sacarose e com RRS. (Barras com letras diferentes são significativamente diferentes segundo a ANOVA a um nível de significância de 5% (Anexo I)).

4.2.2.2. Análise sensorial

Uma vez que o objetivo final do RRS é o de constituir um edulcorante natural que pudesse vir a ser usado em substituição do açúcar testou-se a capacidade de dissolução do RRS. Para tal utilizaram-se duas soluções: água e café instantâneo.

Dissolvendo 1 g de RRS (0,5 mm) em 30 ml de água com agitação e deixou-se repousar. Observou-se que este não dissolve por completo, obtendo-se uma solução turva de cor amarelada e, após algum tempo de repouso, mantém a cor amarelada e obtém-se um depósito no fundo (Figura 18). Testou-se, depois, em café solúvel e obteve-se uma alteração significativa da cor do café, de preto para castanho (Figura 18), o seu sabor também foi alterado, ganhando o sabor característico do RRS, que se deve à caramelização dos açúcares durante a desidratação. Quanto á granulometria do produto, observa-se que ambos têm um depósito residual, mas o RRS de 2 mm forma depósito mais depressa, provavelmente devido ao tamanho das partículas.



Figura 18 - 1 g de RRS dissolvido em água.

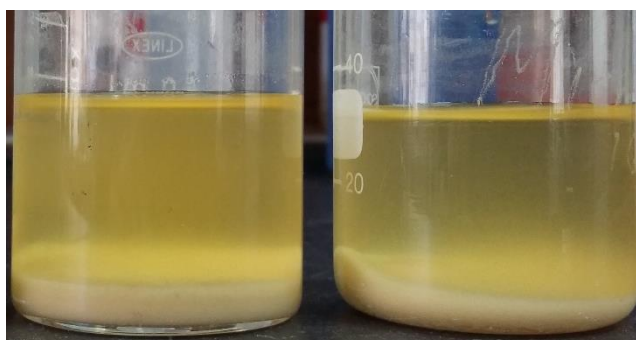


Figura 18 - Solução de água com 1 g de RRS após repousar.



Figura 18 - Solução controlo de café solúvel (à esquerda), café com RRS de 0,5 mm (no centro) e café com RRS de 2 mm (à direita).

Para além de dissolução em soluções aquosas testaram-se outras aplicações como iogurte natural (Figura 19), geleia de fruta (Figura 20) e uma formulação em pudim instantâneo (Figura 20), comparando com as mesmas soluções mas utilizando sacarose.

Em nenhum dos casos o grau de doçura atingiu níveis idênticos aos obtidos com a sacarose.

Tal como aconteceu com o café e a água, quando se adicionou o RRS ao iogurte natural, este ganhou um tom beje e também adquiriu o sabor do RRS (Figura 19). Também se observou que não era muito doce.



Figura 19 - Iogurte de controlo com açúcar (à esquerda) e iogurte com RRS (à direita).

Produziu-se uma geleia de frutos vermelhos com RRS e comparou-se a outra formulada com açúcar branco e verificou-se que a sua cor modificou bastante, tendo ficado com um tom vermelho um pouco pálido (Figura 20). Em relação ao seu sabor, a geleia com RRS permaneceu bastante amarga.

No caso do pudim com RRS, também houve uma alteração da cor, tendo este ficado mais escuro e com um tom acastanhado (Figura 20). Quanto ao sabor, neste destacava-se o sabor característico do RRS e não ficou com um sabor muito doce.



Figura 20 - Na primeira imagem está a geleia com RRS (esquerda) e a geleia com açúcar (direita). Na segunda imagem têm-se o pudim confeccionado com açúcar (esquerda) e o pudim com RRS (direita).

Estes resultados vão ao encontro do esperado, sendo que o RRS só apresenta cerca de 40 % de açúcares e que todos eles apresentam menor poder edulcorante que a sacarose e a hipótese de se utilizar maior percentagem de RRS foi descontinuada devido ao acentuado sabor e aroma a fungo.

Para além destes produtos aplicou-se, também, o RRS numa formulação de bolachas doces. Esta última aplicação foi de todas aquela em que o uso do RRS teve maior sucesso, isto pode dever-se ao facto de que apesar do RRS não as tornar muito doces, as bolachas não têm na sua composição compostos que vão dar o gosto amargo, como por exemplo o iogurte natural e a geleia de frutas.

Para além dos testes realizados com o texturómetro, realizou-se uma prova afetiva para o pudim, o iogurte e às bolachas com RRS, onde se procurou avaliar o grau de aceitação por parte do consumidor.

Em relação aos pudins (Figura 21), pode-se observar que mais de 80 % dos provadores considerou a textura dos pudins com RRS agradável, o que demonstra preferência pela textura mais parecida à dos pudins caseiros. Como, também, já se tinha constatado anteriormente, este produto é considerado pouco doce por 50 % dos indivíduos e 25 % achou “moderado”.

Para a apreciação global obteve-se, também, 50 % que considera o produto agradável e 25 % é-lhe “indiferente”, com os restantes 25 % a considerarem-no desagradável. A aceitação do produto pode ser uma correlação entre a textura e o facto deste pudim ser menos doce que o pudim convencional. Por outro lado, o pudim tem o sabor característico do RRS que não é muito apreciado, o que pode ser a razão de apenas 37,5 % afirmar que “provavelmente compraria”, sendo que, 29,2 % não sabe e 29,2 % respondeu na negativa.

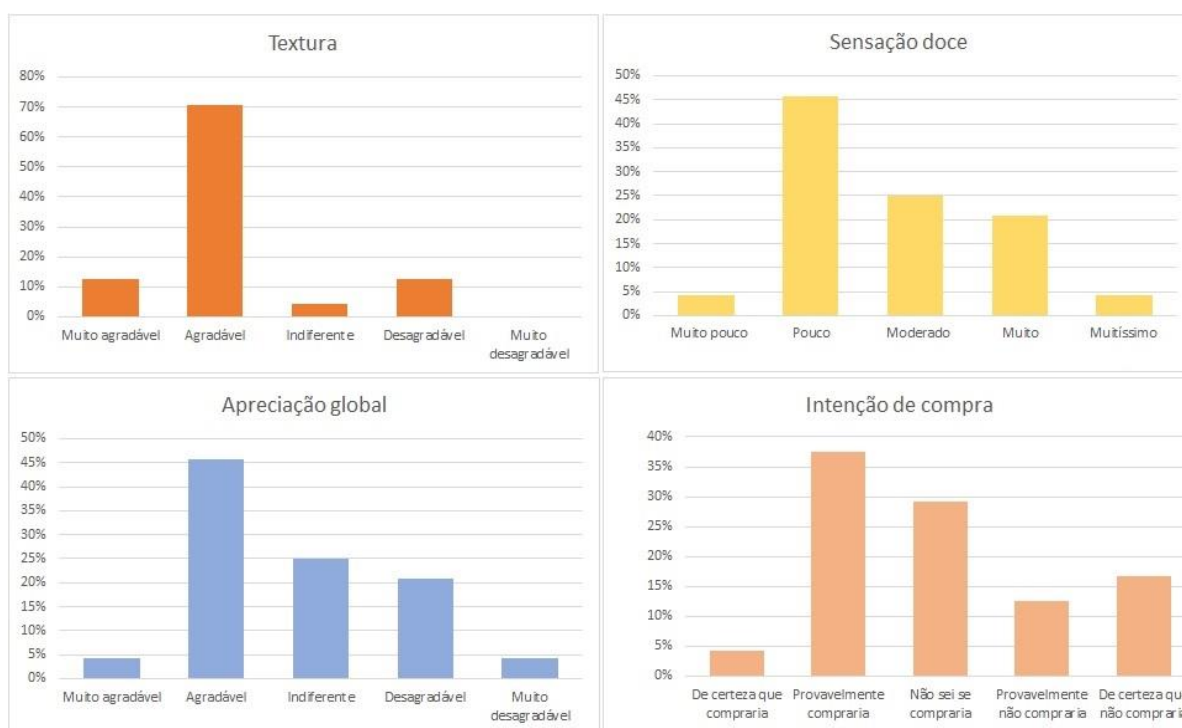


Figura 21 - Resultados do teste afetivo aos pudins com RRS para: Textura, Sensação doce, Apreciação global e Intenção de compra.

Na Figura 22 pode-se observar que a textura das bolachas, também, foi considerada agradável pela maioria dos provadores (76,9 %), por outro lado a sensação doce foi, maioritariamente, considerada como “moderado” (53,8 %), com 34,6 % a achar as bolachas pouco doces. Isto demonstra que o RRS tem um menor poder edulcorante que a sacarose, sendo necessário adicionar mais RRS na formulação dos produtos para que o doce seja mais perceptível.

Apesar da pouca sensação doce, a maioria considerou o produto agradável (61,5 %), com apenas 11,5 % a considerá-lo desagradável. A intensão de compra também é bastante

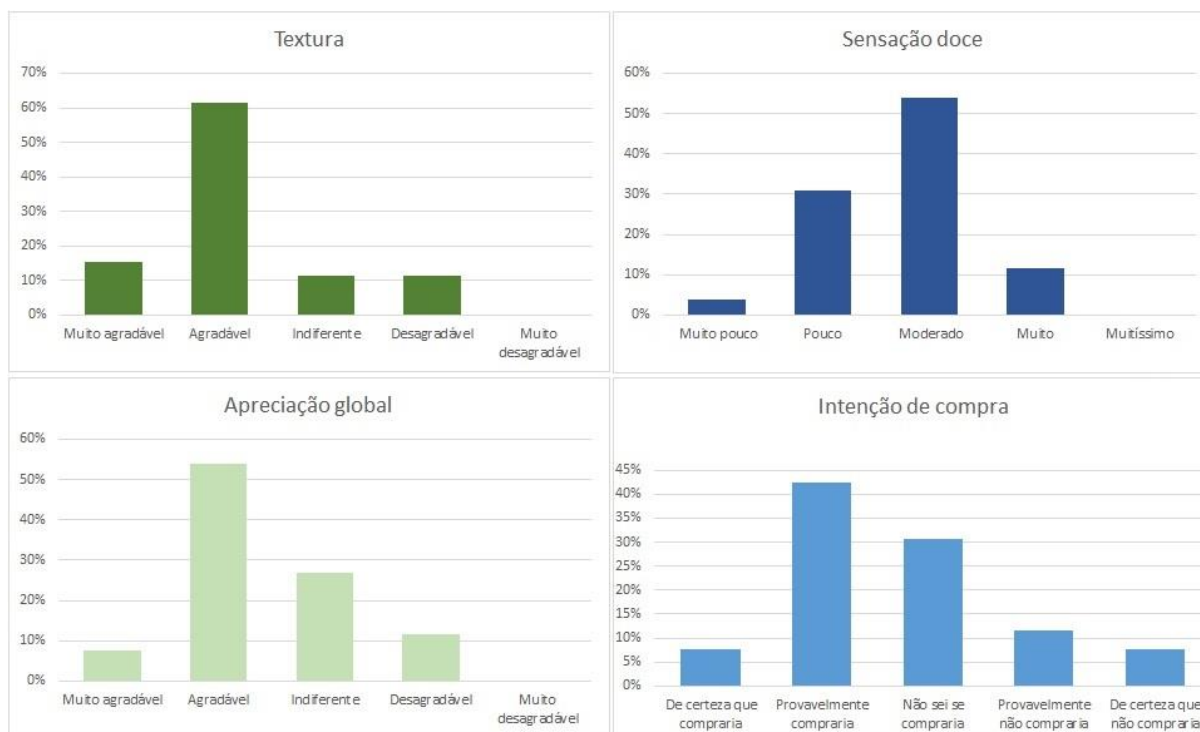


Figura 22 - Resultados do teste afetivo às bolachas com RRS para: Textura, Sensação doce, Apreciação global e Intenção de compra.

positiva, com 43,2 % que “provavelmente comprariam” e 30,8 % que não sabem.

Como se pode ver na Figura 23, a resposta à textura do iogurte foi positiva, tendo 84,6 % o considerado agradável, a apreciação global também foi bastante positiva, com 65,4 % a considerar o iogurte agradável e 34,6 % ponderam que “provavelmente comprariam”. Em contrapartida, nenhum provador considerou o iogurte doce, sendo que, apenas 7,7 % achou a sensação doce “moderada”, isto pode dever-se ao facto de o RRS ter um baixo poder edulcorante e ao facto de o iogurte natural ser muito ácido.

Com estes resultados aos três produtos alimentares, pode-se concluir que apesar do RRS ter menor poder edulcorante que a sacarose e a sua capacidade estruturante é bastante apreciada e que a apreciação global vai depender se o produto é doce, ou seja, se é preferível produtos mais ou menos doces.

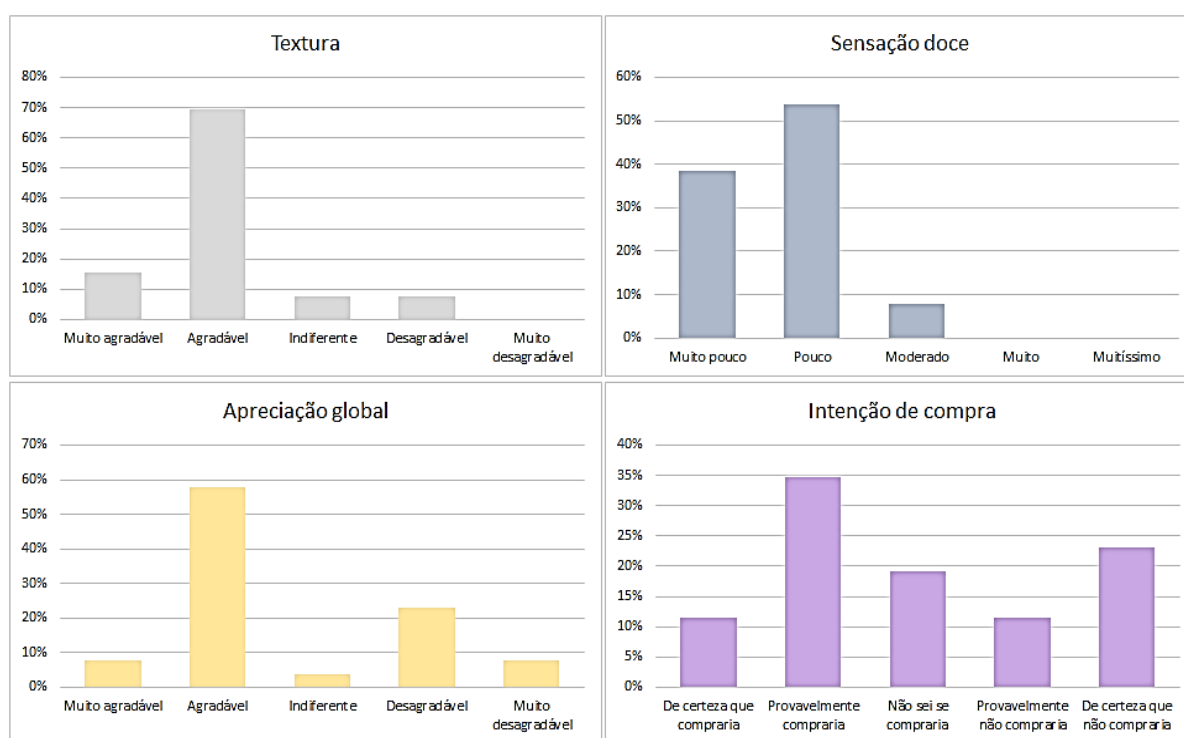


Figura 23 - Resultados do teste afetivo ao iogurte com RRS para: Textura, Sensação doce, Apreciação global e Intenção de compra.

4.3. Análise de custos e rendimento do processo de produção de RRS

Ao longo do processo ocorrem várias perdas. Na maioria das etapas estas perdas correspondem a perda de água, nomeadamente no passo da fermentação e da desidratação, havendo uma perda de, aproximadamente, 10 % e 35 % respetivamente. Estas perdas são positivas pois o que se pretende no final é um produto desidratado.

Em termos de processos, o maior desperdício que ocorre é na filtração, onde é removido cerca de 26 % da massa do produto, este desaproveitamento é necessário para se obter um

produto uniforme, sem pedaços de trinca que não se conseguiu triturar. O rendimento do processo todo vai ser à volta de 60 % face à matéria inicial (Figura 24).

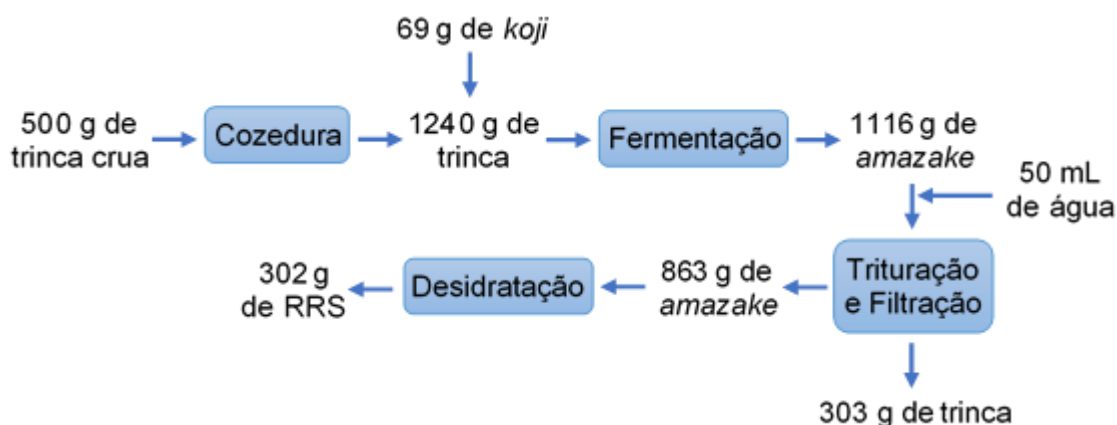


Figura 24 - Fluxograma do processo de produção de RRS.

Quanto aos custos de produção do RRS, os maiores gastos foram na eletricidade, considerando que a matéria-prima consiste na trinca, que poderá ter um custo de 0,66 €/kg (Continente), mas neste caso não tem qualquer custo, e do fungo *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 que custa 170 € pelo inóculo (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute), mas este é só um custo inicial, pois pode-se produzir mais a partir da cultura inicial.

Considerou-se para calcular o custo de produção tanto do *koji* como do RRS o valor de 0,1408 €/kW (EDP) e construiu-se o seguinte quadro:

Tabela 9 - Cálculo do custo de utilização dos vários equipamentos utilizados na produção do *Koji* e do RRS. (o primeiro valor apresentado para a Bimby equivale à cozedura do arroz para o *koji* e o segundo valor à cozedura do arroz para o amazake.)

Equipamento	Potência (kW)	Tempo de trabalho (h)	Energia (kW*h)	Custo (€/kg)
Bimby	1,5	1,00	1,50	0,211
	1,5	0,33	0,50	0,070
Estufa	0,45	15,50	6,98	0,982
Desidratador	0,6	6,00	3,60	0,507
Moinho	2,5	0,20	0,50	0,070

O custo de produção de *koji* apenas tem o custo da cozedura da trinca logo custa à volta de 0,211 €/kg.

O custo de produção do RRS a partir de 1 kg de trinca vai, então, ser o custo de produção do *koji* necessário (5,6 %), mais o custo da cozedura da trinca e o custo de funcionamento da estufa, do desidratador e do moinho, o que vai dar um valor de, aproximadamente, 1,66 € / 0,6 kg RRS, ou seja, 2,77 €/kg de RRS.

Este valor obtido não é real pois refere-se à produção de RRS numa escala muito pequena (1 kg de trinca), com equipamentos que não têm grande capacidade, ou seja, se se aumentasse a produção, diminuiria o custo e não está a contar com o valor da mão de obra.

Comparando com outros adoçantes no mercado, como por exemplo a stevia (17,50 €/kg), a frutose (4,59 €/kg), o açúcar de coco (9,95 €/kg) e o aspartame (6,61 €/kg), o RRS tem um valor obtido muito inferior com vantagens adicionais, sendo que, é produzido a partir de um desperdício da indústria do arroz.

5. Conclusões e perspetivas futuras

A realização deste projeto possibilitou o desenvolvimento e otimização do processo de produção de um adoçante a partir da trinca de arroz, originando, assim, uma alternativa para o reaproveitamento deste subproduto das culturas arrozeiras.

Com este projeto pode-se concluir que o processo de produção do RRS é bastante simples, sem haver necessidade de refinação. Este processo baseia-se, então, na produção de *koji* e de *amazake*. O *koji* é produzido num ambiente aberto à temperatura ambiente e demora entre 3 a 4 dias, no entanto, 1 kg de *koji* pode produzir à volta de 4,4 kg de RRS. Quanto ao *amazake*, este passa por um processo de fermentação, que dura à cerca de 15 horas, numa estufa a 45 °C, e um processo de desidratação de 2 horas e meia, num desidratador a 68 °C.

Conclui-se também que o seu custo de produção é relativamente reduzido, considerando que se gasta 0,211 € por cada kg de *koji* e 2,77 € por cada kg de RRS. Devido às características deste produto, ele não compete com a sacarose, mas sim com outros adoçantes no mercado, como, por exemplo, o açúcar de coco.

O produto tem algumas desvantagens, nomeadamente, o seu baixo poder edulcorante, o facto que não dissolve completamente e a presença do seu sabor característico nos alimentos, que pode ser uma vantagem dependendo dos gostos do consumidor. E tem como vantagem a valorização da trinca, o seu baixo teor em gorduras (1,47 %), a sua composição em proteínas (6,75 %) e a sua aptidão como espessante.

Por fim, tem-se, ainda, o valor acrescido da produção de *koji*, que é necessário para a produção do RRS, mas pode, também, ser de interesse pois tem um baixo custo de produção e está no mercado a rondar um valor desde 25 €/kg (Kensho Mediterranean sake) a 60 €/kg (Kawashimaya).

Para finalizar o projeto ainda falta fazer uma análise mais completa ao perfil nutricional, analisando os micronutrientes constituintes do RRS, o seu índice glicémico e falta definir o processo a nível industrial, ajustando os respetivos custos associados.

6. Bibliografia

Aderemi, B. O., Abu, E. e Highina, B. K. 2008. *The kinetics of glucose production from rice straw by Aspergillus niger*. African Journal of Biotechnology. 7(11):1745-1752.

Akita Konno CO., LTD. *Outline of Koji and Yeast stater producing process*. Disponível em: <http://www.akita-konno.co.jp/en/dekirumade/index.html>. Acesso em: 09/07/2019.

Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE). *Edulcorantes*. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/aditivos-alimentares/edulcorantes.aspx>. Acesso em: 12/07/2019.

Banks, W. e Greenwood, C. T. 1975. *Starch and its components*. 1ª edição. Edinburgh: Aberdeen University press. 342 páginas.

Bamforth, C. H. 2005. *Food, Fermentation and Micro-organisms*. 1ª edição. Oxford: Blackwell Publishing. 216 páginas.

Barbesgaard, P., Heldt-Hansen, H. P. e Diderichsen, B. 1992. *On the safety of Aspergillus oryzae: a review*. Applied Microbiology and Biotechnology. 36:569-572.

Blanshard, J. M. V. e Mitchell, J. R. 1979. *Polysaccharides in food*. 1ª edição. London: Butterworth. 368 páginas.

Blumenthal, C. Z. 2004. *Production of toxic metabolites in Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, and Trichoderma reesei: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi*. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 39:214–228.

Bourne, M. C. 2002. *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*. 2ª edição. London: Academic Press. 427 páginas.

Brito, R. S., Ferreira, F., Lourenço, N. D., Pinheiro, H. M. e Matos, J. S. 2013. *Espectrofotometria para monitorização da qualidade de água residual em drenagem urbana*. Recursos Hídricos. 34(1):5-16.

Burdock, G. A., Soni, M. G. e Carabin, I. G. 2001. *Evaluation of Health Aspects of Kojic Acid in Food*. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 33:80–101.

Chang, C. T., Tang, M. S. e Lin, C. F. 1995. *Purification and properties of alpha-amylase from Aspergillus oryzae ATCC 76080*. Biochemistry and Molecular Biology International. 36(1):185-193.

Chen, N. H. 2018. *Amazake (Fermented Japanese Rice Drink)*. Disponível em: <https://www.justonecookbook.com/amazake/>. Acesso em: 09/07/2019.

DGADR - Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural. *Arroz Carolino das Lezírias Ribatejanas - Indicação Geográfica Protegida*. Caderno de especificações. 81 p. Disponível em: <https://tradicional.dgadr.gov.pt/pt/cat/hortícolas-e-cereais/630-arroz-carolino-das-lezirias-ribatejanas-igp>. Acesso em: 09/07/2019.

Ellen Macarthur Foundation. *Cities and Circular Economy for Food*. Disponível em: <https://gulbenkian.pt/project/economia-circular-e-alimentacao-nas-cidades/>. Acesso em: 09/01/2020.

Fontana, A. J. 2001. *Water Activity's Role in Food Safety and Quality*. Food Safety Magazine. 7(1).

Fraia, R. 2015. *Açúcar de beterraba – História*. Disponível em: <http://www.saudecomciencia.com/2012/09/acucar-de-beterraba-historia.html>. Acesso em: 13/08/2019.

FSAI - Food Safety Authority of Ireland. 2019. *Guidance Note No. 18 - Validation of Product Shelf-life*. 4ª revisão. Dublin: Food Safety Authority of Ireland. 50 páginas.

Fundação Portuguesa de Cardiologia. *Fatores de Risco - Diabetes*. Disponível em: <http://www.fpcardiologia.pt/saude-do-coracao/fatores-de-risco/diabetes/>. Acesso em: 09/01/2020.

Gaspar, F. 2017. *Identificação e quantificação de hidratos de carbono nas raízes de mirtilos e framboesas*. Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Agronomia para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Agronómica – Hortofruticultura e Viticultura. 97 páginas.

Harrison, J. A. e Andress, E. L. 2000. *Preserving Food: Drying Fruits and Vegetables*. University of Georgia Cooperative Extension Service. 12 páginas.

Hata, Y., Ishida, H., Kojima, Y., Ichikawa, E., Kawato, A., Suginami, K. e Imayasu, S. 1997. *Comparison of Two Glucoamylases Produced by Aspergillus oryzae in Solid-State Culture (Koji) and in Submerged Culture*. Journal of Fermentation and Bioengineering. 84(6):532-537.

Hata, Y., Ishida, H., Ichikawa, E., Kawato, A., Suginami, K. e Imayasu, S. 1998. *Nucleotide sequence of an alternative glucoamylase-encoding gene (glaB) expressed in solid-state culture of Aspergillus oryzae*. Gene. 207:127–134.

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. *Tabela da Composição de Alimentos (TCA) - Arroz carolino branqueado cru*. Disponível em: <http://www2.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetailheAlimento.aspx?ID=IS400>. Acesso em: 09/08/2019.

Januário, M. I. 2014. *Tecnologia do Açúcar de Beterraba*. Apresentação efetuada no âmbito da disciplina de Tecnologia Alimentar I – Tecnologia do Açúcar e outros Edulcorantes. 19 diapositivos.

Januário, M. I. 2014. *Sector do Açúcar e dos Edulcorantes*. Apresentação efetuada no âmbito da disciplina de Tecnologia Alimentar I – Tecnologia do Açúcar e outros Edulcorantes. 19 diapositivos.

Kitamoto, K. 2002. *Molecular biology of the Koji molds*. *Advances in Applied Microbiology*. 51:1-51

Lacasse, D. 1995. *Introdução à Microbiologia Alimentar*. 1ª edição. Lisboa: Instituto Piaget. 577 páginas.

Jebor, M. A., Ali, Z. M. e Hassan, B. A. 2014. *Purification and characterization of the glucoamylase from Aspergillus niger*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3(1): 63-75.

Machida, M., Yamada, O. e Gomi, K. 2008. *Genomics of Aspergillus oryzae: Learning from the History of Koji Mold and Exploration of Its Future*. *DNA Research*. 15:173–183.

More, S. S., Jain, A., Thacker, A., Chandrika, C., Gokhale, M. e Chang, P. 2012. *Purification and properties of fungal alkaline α -amylase from Aspergillus oryzae (Ah1b.) Cohn*. *BioTechnology, an Indian Journal*. 6(3):78-86.

Nabors, L. 2012. *O. Alternative Sweeteners*. 4ª edição. Boca Raton: CRC Press Taylor and Francis Group. 548 páginas.

Nagashima, T., Yamamoto, Y., Kitamoto, K. e Kumagai, C. 1995. *Functional role of Aspergillus oryzae glucoamylase C-terminal domain investigated using its cDNA*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 80(3):280-282.

NC-ISO 20483. 2009. *Cereales e legumbres - Determinación del contenido de nitrógeno y cálculo del contenido de la proteína bruta: Método de Kjeldahl*. Habana: Oficina Nacional de Normalización, 18 páginas.

Noronha, J. 2003. *Análise Sensorial – Metodologia*. Material de apoio às aulas de Análise Sensorial lecionadas na Escola Superior Agrária de Coimbra. 74 páginas.

NP 4168. 1991. *Cereais e derivados – Determinação do teor de matéria gorda total*. Lisboa: IPQ, 7 páginas.

Nuffield Foundation. 2011. *Making a calibration curve for starch concentration*. Disponível em: <https://www.nuffieldfoundation.org/practical-biology/making-calibration-curve-starch-concentration>. Acesso em: 09/04/2019.

Oguro, Y., Nakamura, A. e Kurahashi, A. 2019. *Effect of temperature on saccharification and oligosaccharide production efficiency in koji amazake*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 127(5):570-574.

Oguro, Y., Nishiwaki, T., Shinada, R., Kobayashi, K. e Kurahashi, A. 2017. *Metabolite profile of koji amazake and its lactic acid fermentation product by Lactobacillus sakei UONUMA*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 124(2):178-183.

Pitt, J. I. e Hocking, A. D. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. 3ª edição. New York: Springer Science + Business Media. 519 páginas.

Qasem, A. A., Alamri, M.S., Mohamed, A. A., Hussain, S., Mahmood, K. e Ibraheem, M. A. 2017. *High soluble-fiber pudding: formulation, processing, texture and sensory properties*. Journal of Food Processing and Preservation. 41(3):1745-4549.

Rahman, M. S. 2007. *Handbook of Food Preservation*. 2ª edição. Boca Raton: CRC Press Taylor and Francis Group. 1068 páginas.

Rosendo, I. 2018. *Economia Circular no Setor dos Alimentos & Bebidas: O caso do Canal HORECA*. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, Perfil de Engenharia de Sistemas Ambientais. 75 páginas.

Saigusa, N. e Ohba, R. 2007. *Effects of koji Production and Saccharification Time on the Antioxidant Activity of amazake*. Food Science and Technology Research. 13(2):162-165.

Santos, A. A., Deoti, J. R., Müller, G., Dário, M. G., Stambuk, B. U. e Alves, S. L. 2017. *Dosagem de açúcares redutores com o reagente DNS em microplaca*. Brazilian Journal of Food Technology. 20.

Sequeira, C. 2012. *Análise de açúcares e ácidos orgânicos em sumos comerciais: aplicação de HPLC-SEC-UV-IR e língua eletrônica*. Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar. 66 páginas.

Sidul. *Um pouco de história*. Disponível em: <https://www.sidul.pt/um-pouco-de-historia>. Acesso em: 20/11/2018.

Sigma-Aldrich, Merck. *Universal Protease Activity Assay: Casein as a Substrate*. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/protease-activity-assay.html>. Acesso em: 09/04/2019.

Sigma-Aldrich, Merck. *Enzymatic Assay of α -Amylase (EC 3.2.1.1)*. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-alpha-amylase.html>. Acesso em: 09/04/2019.

South River Miso Company. *Koji Making Process*. Disponível em: <http://www.southernrivermiso.com/store/pg/29-Miso-Tour-Koji-Making-Process.html>. Acesso em: 09/07/2019.

SRAS (Sugar Research Advisory Service). *The importance and function of sugar in our food*. Disponível em: <https://www.srasanz.org/sras/basics-sugar/functionsuses-food/>. Acesso em: 09/07/2019.

Tanaka, K., Kushiro, M. e Manabe, M. 2006. *A review of studies and measures to improve the mycotoxical safety of traditional Japanese mold-fermented foods*. *Mycotoxin Research*. 22(3):153–158.

Tengborg, C., Galbe, M. e Zacchi, G. 2001. *Influence on enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood*. *Biotechnology Progress*. 17:110-117.

Texture Technology (ttc). *Overview of Texture Profile Analysis (TPA)*. Disponível em: <https://texturetechnologies.com/resources/texture-profile-analysis>. Acesso em: 11/07/2019.

Tomasik, P. 2004. *Chemical and Functional Properties of Food Saccharides*. 1ª edição. Boca Raton: CRC Press LLC. 386 páginas.

Trinidad, P. T., Mallillin, A. C., Avena, E. M., Rodriguez, R. G., Borlagdan, M. S., Cid, K. B. e Biona, K. T. 2015. *Coconut sap sugar and syrup: a promising functional food/ingredient*. *Acta Manilana*. 63:25-32.

Walter, M., Marchezan, E. e Avila, L. A. 2008. *Arroz: composição e características nutricionais*. *Ciência Rural, Santa Maria*. 38(4):1184-1192.

Weihrauch, M. R. e Diehl, V. 2004. *Artificial sweeteners - do they bear a carcinogenic risk*. *Annals of Oncology*. 15:1460-1465.

Wen, Z., Liao, W. e Chen, S. 2004. *Hydrolysis of animal manure lignocellulosic for reducing sugar production*. *Bioresource Technology*. 91:31-39.

Wicklow, D.T. 1983. *Taxonomic features and ecological significance of sclerotia*. Northern Regional Research Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois. 12 páginas.

Wylie, A. 2019. *Amazake: An ancient tradition for modern health*. Disponível em: https://en.sake-times.com/learn/amazake_health. Acesso em: 09/07/2019.

Zenebon, O., Pascuet, N. S. e Tiglea, P. 2008. *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos*. 4ª edição, 1ª edição digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 1020 páginas.

Imagens

Carreiro, M. 2008. *Colheita do arroz*. Disponível em: <https://olhares.sapo.pt/colheita-do-arroz-foto1668940.html>. Acesso em: 18/07/2019.

Costa, K. A., Guimarães, A. C., Reis, M. M. e Santana, C. S. 2017. *Estudo do processo de lixiviação controlada da escória de aciaria em extrator Soxhlet visando emprego em pavimentos*. Revista Matéria. 22(2):1-19.

Hazzaa, M. M., Saad. E. M., Hassan, H. M. e Ibrahim, E. I. 2013. *High Production of Kojic Acid Crystals by Isolated Aspergillus oryzae var. effusus NRC14*. Journal of Applied Sciences Research. 9(3):1714-1723.

Lewandowski, I., Gaudet, N., Lask, J., Maier, J., Tchouga, B. e Vargas-Carpintero, R. 2018. *Bioeconomy - Shaping the Transition to a Sustainable, Biobased Economy*. 1ª edição. Switzerland: Springer International Publishing AG. 356 páginas.

Texture Technologies. *Overview of Texture Profile Analysis (TPA)*. Disponível em: <https://texturetechnologies.com/resources/texture-profile-analysis>. Acesso em: 09/08/2019.

7. Anexos

7.1. Reta de calibração da proteína solúvel

Para a realização da curva de calibração, preparou-se uma solução-mãe de caseína com uma concentração de 100 µg/ml. A partir desta solução prepararam-se, em duplicado, soluções com as concentrações indicadas na Tabela 10.

Tabela 10 - Quantidades necessárias dos reagentes para as diferentes concentrações de caseína.

Reagentes	Concentração (µg/ml)							
	0	1	2,5	5	10	15	20	25
Solução de caseína	-	20 µL	50 µL	100 µL	200 µL	300 µL	400 µL	500 µL
Água Milli-Q	2000 µL	1980 µL	1950 µL	1900 µL	1800 µL	1700 µL	1600 µL	1500 µL

Depois retiraram-se 500 µL de cada solução para cuvetes e juntou-se mais 500 µL do reagente de Bradford e, por fim, fez-se a leitura das soluções no espectrofotômetro com um comprimento de onda de 595 nm e construiu-se um gráfico da concentração em função da absorvância, do qual se obteve uma curva com a equação:

$y = 0,0114x - 0,0013$ e um R^2 de 0,998 (Figura 25 - Curva de calibração para determinar a concentração de proteína.).

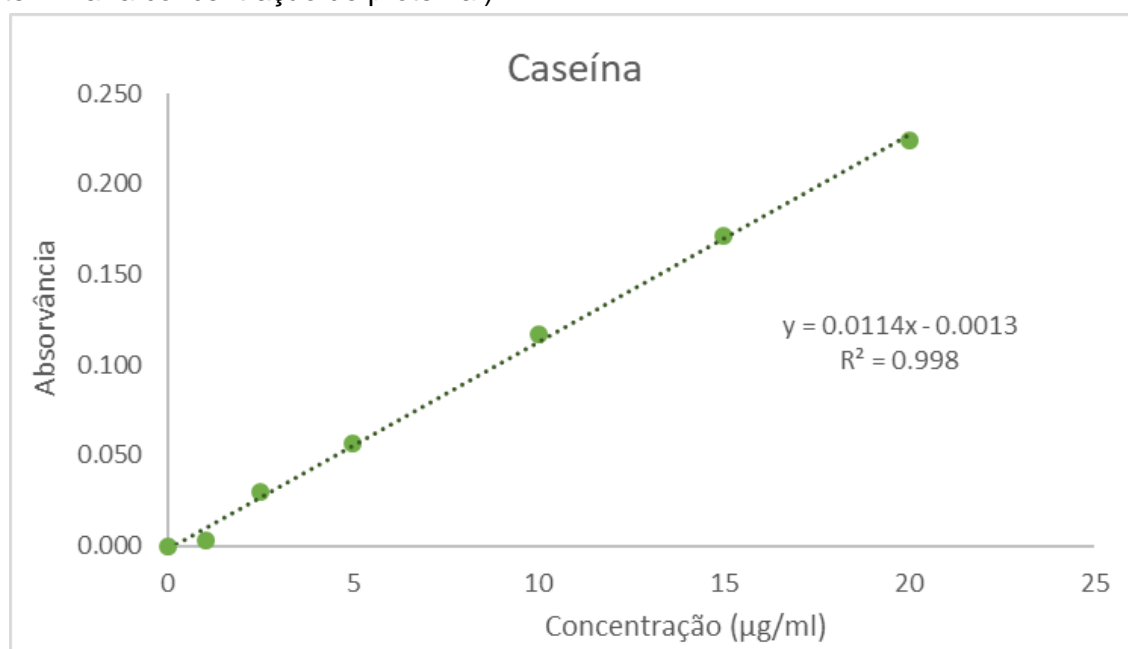


Figura 25 - Curva de calibração para determinar a concentração de proteína.

7.2. Reta de calibração do amido

Para a realização da curva de calibração, preparou-se uma solução-mãe de amido com uma concentração de 1% (w/v) e uma solução de iodo 0,01 M. A partir destas soluções prepararam-se, em duplicado, soluções com as concentrações indicadas na Tabela 11 Tabela 10.

Tabela 11 - Quantidades necessárias dos reagentes para as diferentes concentrações de amido.

Reagente	Concentração (mg/ml)							
	0,5	1	2	3	5	7	10	0
Solução de amido	0,5 ml	1 ml	2 ml	3 ml	5 ml	7 ml	10 ml	-
Água Milli-Q	9,5 ml	9 ml	8 ml	7 ml	5 ml	3 ml	-	10 ml
Solução de iodo	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
	15	20	25	30	35	40	50	
Solução de amido	1,5 ml	2 ml	2,5 ml	3 ml	3,5 ml	4 ml	5 ml	
Água Milli-Q	8,5 ml	8 ml	7,5 ml	7 ml	6,5 ml	6 ml	5 ml	
Solução de iodo	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	

Por fim fez-se a leitura das soluções no espectrofotômetro com um comprimento de onda de 610 nm e construiu-se dois gráficos de concentração em função da absorvância, dos quais se obteve duas curvas com as equações: $y = 0,0333x + 0,0158$ e um R^2 de 0,9906 e $y = 0,0122x + 0,2373$ e um R^2 de 0,9802 (Figura 26).

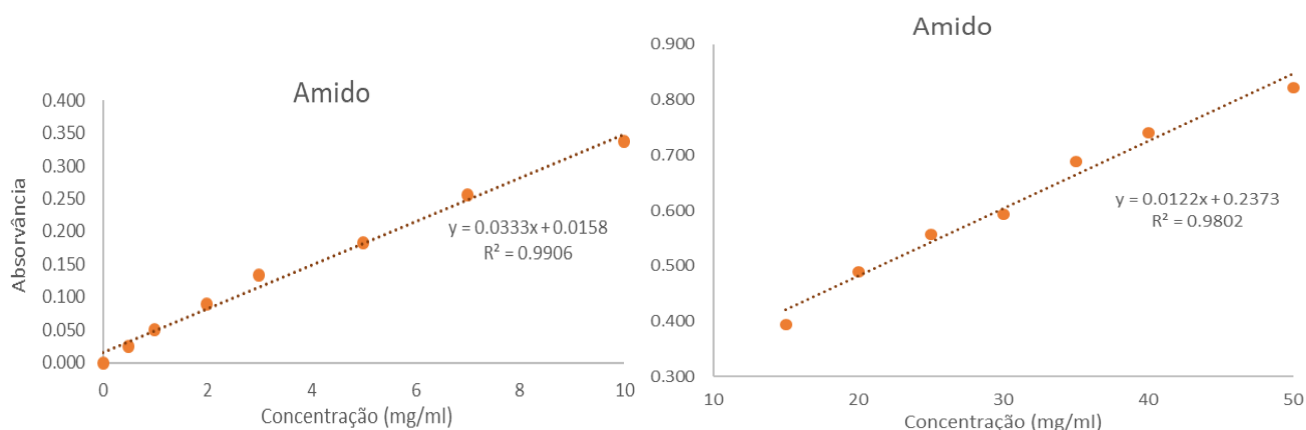


Figura 26 - Curvas de calibração para determinar a concentração do amido. A primeira curva (esquerda) compreende concentrações entre 0 e 10 mg/mL e a segunda curva (direita) abrange concentrações entre 15 e 50 mg/mL.

7.3. Reta de calibração dos açúcares redutores pelo método DNS

Para a realização da curva de calibração, preparou-se uma solução-mãe de maltose com uma concentração de 0,2 % (w/v) e uma solução corante (tartarato de sódio e potássio 2.65 M e ácido 3,5-Dinitrosalicílico 96 mM). A partir destas soluções prepararam-se, em duplicado, soluções com as concentrações indicadas na Tabela 12Tabela 11Tabela 10.

Tabela 12 - Quantidades necessárias dos reagentes para as diferentes concentrações de maltose.

Reagente	Concentração (mg/ml)							
	0,05	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2	0
Solução de maltose	0,05 ml	0,2 ml	0,4 ml	0,6 ml	0,8 ml	1 ml	2 ml	-
Água Milli-Q	1,95 ml	1,8 ml	1,6 ml	1,4 ml	1,2 ml	1 ml	-	2 ml
Solução corante	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

De seguida, incubou-se as soluções a analisar 15 minutos a 100 °C, arrefeceu-se em gelo, adicionou-se 9 mL de água desmineralizada e leu-se a absorvância num espectrofotómetro com um comprimento de onda de 540 nm e construiu-se um gráfico da concentração em função da absorvância, do qual se obteve uma curva com a equação:

$y = 0,0005x + 0,0172$ e um R^2 de 0,9917 (Figura 27).

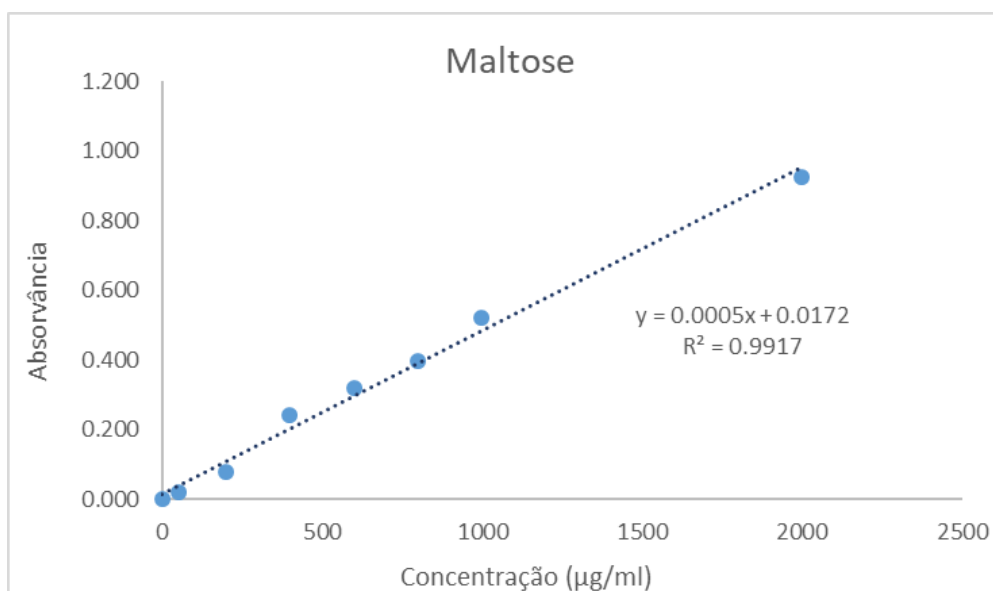


Figura 27 - Curva de calibração para determinar a concentração de açúcares redutores.

7.4. Retas de calibração da glucose, maltose e maltotriose por HPLC

7.4.1. Reta de calibração da glucose

Tabela 13 - Área dos picos e respectivos tempos de retenção para as várias concentrações de glucose, obtidos na análise HPLC.

Concentração (g/L)		Retention Time	Area
1	1	10.385	99709362
	2	14.077	10882523
2	1	10.363	84422715
	2	10.35	92112125
5	1	10.367	86020208
	2	14.109	46873234
10	1	10.403	101541656
	2	14.147	110301031
15	1	10.296	71412127
	2	14.122	126216200
20	1	10.361	92009346
	2	14.157	199344388

Tabela 15 - Razão entre a área 1 e 2 obtidas no HPLC, para a glucose.

[]	area: 1	area: 2	Razão
1	99709362	10882523	0.109142439
2	88267420	17313865.5	0.196130486
5	86020208	46873234	0.544909564
10	101541656	110301031	1.086263858
15	71412127	126216200	1.767433702
20	92009346	199344388	2.166566731

Tabela 14 - Concentrações de glucose e respectivas razões entre a área 1 e 2.

[glucose]	razão
0	0
1	0.109142439
2	0.196130486
5	0.544909564
10	1.086263858
15	1.767433702
20	2.166566731

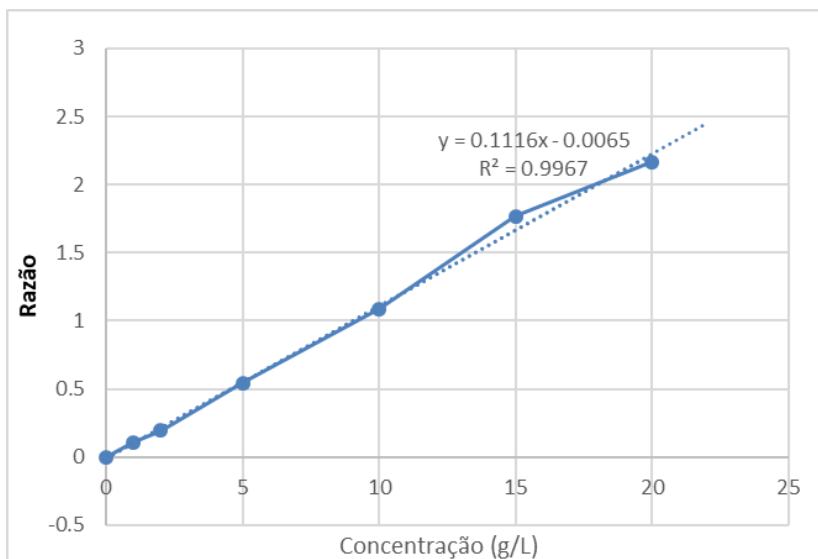


Figura 28 - Curva de calibração para determinar a concentração de glucose.

7.4.2. Retra de calibraçaõ da maltose

Tabela 16 - Área dos picos e respectivos tempos de retençaõ para as várias concentrações de maltose, obtidos na análise HPLC.

Maltose			
Concentraçaõ (g/L)		Retention Time	Area
1	1	10.35	99943895
	2	12.36	9749038.5
5	1	10.415	101284927
	2	12.409	49592240
10	1	10.43	119539281
	2	12.427	135059861
20	1	10.425	109854781
	2	12.483	266565735
40	1	10.338	85859647
	2	12.428	430427130
60	1	10.389	89701801
	2	12.538	636248830

Tabela 18 - Razãõ entre a área 1 e 2 obtidas no HPLC, para a maltose.

[]	area: 1	area: 2	Razãõ
1	99943895	9749038.5	0.097545113
5	101284927	49592240	0.489630999
10	119539281	135059861	1.129836652
20	109854781	266565735	2.426528300
40	85859647	430427130	5.013148144
60	89701801	636248830	7.092932616

Tabela 17 - Concentrações de maltose e respectivas razões entre a área 1 e 2.

[maltose]	razãõ
0	0
1	0.097545113
5	0.489630999
10	1.129836652
20	2.426528300
40	5.013148144
60	7.092932616

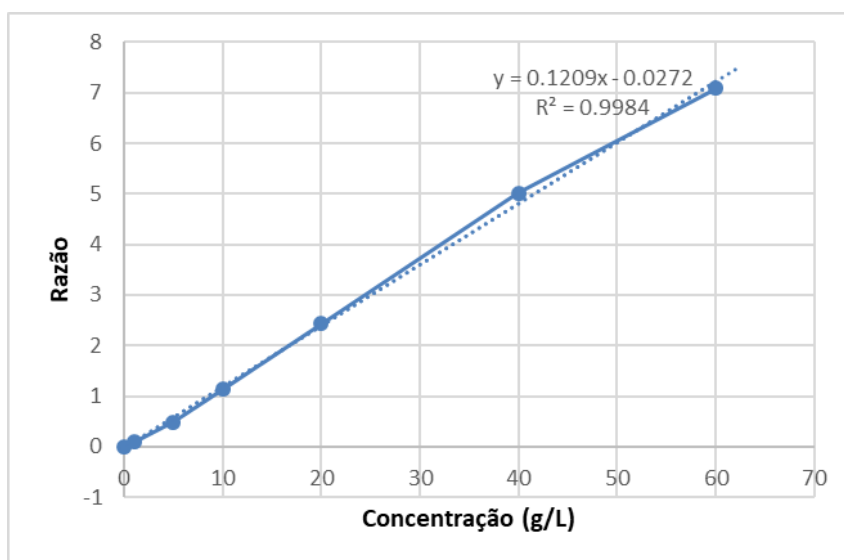


Figura 29 - Curva de calibraçaõ para determinar a concentraçaõ de maltose.

7.4.3. Retas de calibração da maltotriose

Tabela 19 - Área dos picos e respectivos tempos de retenção para as várias concentrações de maltotriose, obtidos na análise HPLC.

Maltotriose			
Concentração (g/L)		Retention Time	Area
1	1	10.051	51418479
	2	10.903	10741828
2	1	10.034	74461116
	2	10.89	16962415
5	1	10.137	63257273
	2	11.268	34042506
10	1	10.138	72394506
	2	11.391	94717619
15	1	10.119	66575569
	2	11.409	131758776
20	1	10.143	70916597
	2	11.418	137635926.5

Tabela 21 - Razão entre a área 1 e 2 obtidas no HPLC, para a maltotriose.

[]	area: 2	area: 1	razão
1	10741828	51418479	0.208909875
2	16962415	74461116	0.22780232
5	34042506	63257273	0.538159557
10	94717619	72394506	1.308353689
15	131758776	66575569	1.979085992
20	137635926.5	70916597	1.940814031

Tabela 20 - Concentrações de maltotriose e respectivas razões entre a área 1 e 2.

[maltotriose]	razão
0	0
1	0.208909875
2	0.22780232
5	0.538159557
10	1.308353689
15	1.979085992
20	1.942343515

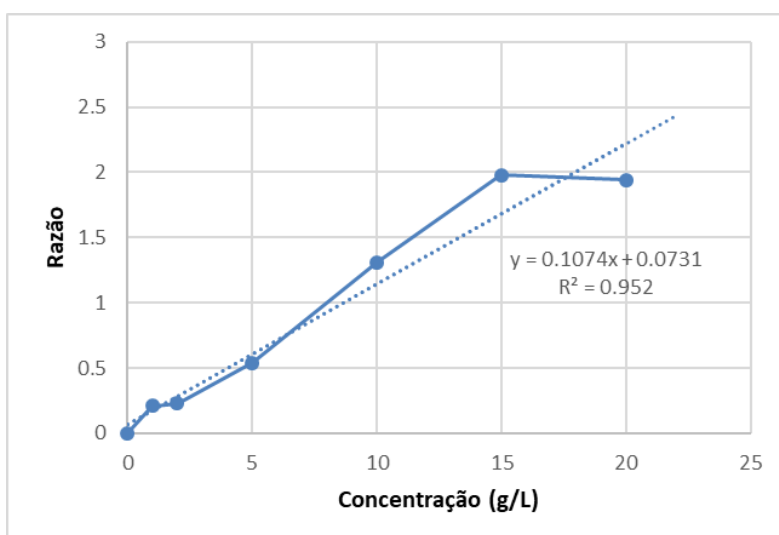


Figura 30 - Curva de calibração para determinar a concentração de maltotriose.

7.5. Ficha de análise sensorial prova afetiva

Análise sensorial pudins - Teste afetivo de aceitação

Nome: _____ Idade: _____ Profissão: _____ Código: _____

Aspeto

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Cor

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Aroma

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Sabor

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Sensação doce

- Muito pouco
- Pouco
- Moderado
- Muito
- Muitíssimo

Tempo de permanência do sabor na boca

- Muito pouco
- Pouco
- Moderado
- Muito
- Muitíssimo

Textura

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Apreciação global

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Intenção de compra

- De certeza que compraria
- Provavelmente compraria
- Não sei se compraria
- Provavelmente não compraria
- De certeza que não compraria

Observações:

Análise sensorial pudins - Teste afetivo de aceitação

Nome: _____ Idade: _____ Profissão: _____ Código: _____

Aspeto

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Cor

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Aroma

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Sabor

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Sensação doce

- Muito pouco
- Pouco
- Moderado
- Muito
- Muitíssimo

**Tempo de permanência do
sabor na boca**

- Muito pouco
- Pouco
- Moderado
- Muito
- Muitíssimo

Textura

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Apreciação global

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Intenção de compra

- De certeza que compraria
- Provavelmente compraria
- Não sei se compraria
- Provavelmente não compraria
- De certeza que não compraria

Observações:

Qual das amostras prefere: 2A4 4C6

Análise sensorial iogurte - Teste afetivo de aceitação

Nome: _____ Idade: _____ Profissão: _____ Código: _____

Aspeto

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Cor

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Aroma

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Sabor

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Sensação doce

- Muito pouco
- Pouco
- Moderado
- Muito
- Muitíssimo

Intensidade do sabor a iogurte

- Muito pouco
- Pouco
- Moderado
- Muito
- Muitíssimo

**Tempo de permanência do
sabor na boca**

- Muito pouco
- Pouco
- Moderado
- Muito
- Muitíssimo

Textura

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Apreciação global

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Intenção de compra

- De certeza que compraria
- Provavelmente compraria
- Não sei se compraria
- Provavelmente não compraria
- De certeza que não compraria

Observações:

Análise sensorial bolachas - Teste afetivo de aceitação

Nome: _____ Idade: _____ Profissão: _____ Código: _____

Aspeto

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Cor

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Aroma

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Sabor

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Sensação doce

- Muito pouco
- Pouco
- Moderado
- Muito
- Muitíssimo

**Tempo de permanência do
sabor na boca**

- Muito pouco
- Pouco
- Moderado
- Muito
- Muitíssimo

Textura

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Apreciação global

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Intenção de compra

- De certeza que compraria
- Provavelmente compraria
- Não sei se compraria
- Provavelmente não compraria
- De certeza que não compraria

Observações:

Análise sensorial bolachas - Teste afetivo de aceitação

Nome: _____ Idade: _____ Profissão: _____ Código: _____

Aspeto

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Cor

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Aroma

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Sabor

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Sensação doce

- Muito pouco
- Pouco
- Moderado
- Muito
- Muitíssimo

**Tempo de permanência do
sabor na boca**

- Muito pouco
- Pouco
- Moderado
- Muito
- Muitíssimo

Textura

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Apreciação global

- Muito agradável
- Agradável
- Indiferente
- Desagradável
- Muito desagradável

Intenção de compra

- De certeza que compraria
- Provavelmente compraria
- Não sei se compraria
- Provavelmente não compraria
- De certeza que não compraria

Observações:

Qual das amostras prefere: 3R7 9T5