



**Desenvolvimento de um corante alimentar natural à base de antocianinas
obtido a partir do epicarpo de frutos de *Prunus spinosa* L.: otimização da
extração e estudo de aplicação**

Maria Gabriela Leichtweis

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e à Universidade
Tecnológica Federal do Paraná para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e
Segurança Alimentar no âmbito de um programa de Dupla Diplomação*

Orientado por:

Doutora Lillian Barros

Prof^a Doutora Isabel C. F. R. Ferreira

Prof^o Doutor Ilton José Baraldi

Bragança

2018



**Desenvolvimento de um corante alimentar natural à base de antocianinas
obtido a partir do epicarpo de frutos de *Prunus spinosa* L.: otimização da
extração e estudo de aplicação**

Maria Gabriela Leichtweis

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e à Universidade
Tecnológica Federal do Paraná para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e
Segurança Alimentar no âmbito de um programa de Dupla Diplomação*

Orientado por:

Doutora Lillian Barros

Prof^a Doutora Isabel C. F. R. Ferreira

Prof^o Doutor Ilton José Baraldi

Bragança

2018

Este trabalho é financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Regional Norte 2020, no âmbito do Projeto NORTE-01-0145-FEDER-023289 (DeCode) e Norte-01-0247-FEDER-024479 (projeto *Mobilizador ValorNatural*), e pelo programa FEDER-Interreg España-Portugal, no âmbito do projeto 0377_Iberphenol_6_E.



AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus que a cada dia mais me abençoa com saúde, sabedoria e paciência. Aos meus pais, pela educação e carinho que me deram na vida e por todo apoio e motivação na realização desta conquista.

Agradeço em especial às orientadoras Doutora Lillian Barros e Professora Doutora Isabel C.F.R. Ferreira, pelo acolhimento, disponibilidade e por toda a dedicação e ensinamentos proporcionados com paciência. Sem dúvidas foi um privilégio e um prazer trabalhar num grupo com pessoas tão inteligentes, competentes e atenciosas. Ao orientador Professor Doutor Ilton José Baraldi da UTFPR de Medianeira, por toda a colaboração durante este período.

Agradeço à toda equipa do BioChemCore, em especial à Doutora Carla Pereira e ao Mestre Custório L. Roriz, que me deram todo o apoio e acompanhamento com muita atenção e carinho.

A todos os meus amigos que estiveram em Portugal e que igualmente passaram por toda esta caminhada, entre os bons e difíceis momentos, sempre estivemos juntos motivando e torcendo uns pelos outros. Agradeço toda a amizade e companheirismo e desejo-vos todo o sucesso do mundo.

Agradeço também aos familiares e amigos que mesmo estando longe acompanharam-me e apoiaram-me em todos os momentos. Em especial a minha grande amiga Andréia M. Zailo e todos que foram fundamentais para que eu pudesse chegar aqui.

Finalmente, agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná e ao Instituto Politécnico de Bragança por terem disponibilizado este mestrado e por todo o apoio financeiro cedido.

Muito Obrigada!



RESUMO

Entre as propriedades organolépticas, a cor exerce um papel muito importante na percepção global de um alimento, uma vez que a visão é normalmente o primeiro contato que o consumidor tem com o produto. Neste sentido, os corantes têm sido amplamente utilizados como aditivos alimentares, para suprir ou intensificar os aspectos de coloração dos alimentos, tornando-os mais atrativos e agradáveis. No entanto, devido à preocupação que os consumidores têm com a saúde e o registro de efeitos adversos de alguns corantes artificiais, existe um grande interesse na sua substituição por alternativas naturais mais seguras. As antocianinas são um grupo de pigmentos de coloração vermelha, azul e violeta, presentes em muitas flores e frutos, podendo ser consideradas alternativas aos corantes artificiais.

Prunus spinosa L. é um arbusto selvagem que dá origem a frutos de sabor amargo e adstringente pouco explorados comercialmente, mas que apresentam níveis elevados de antocianinas, mais especificamente cianidina 3-rutinósido e peonidina 3-rutinósido, concentradas no epicarpo. Assim, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um corante alimentar natural a partir da extração de antocianinas dos frutos de *P. spinosa*, aliando os crescentes interesses na substituição dos corantes artificiais por alternativas naturais mais seguras à valorização de produtos agrícolas de fontes subexploradas.

Foram otimizadas as condições que maximizam a extração de antocianinas do epicarpo de frutos de *P. spinosa*, comparando-se duas técnicas de extração, sendo uma convencional assistida por calor (HAE) e outra alternativa assistida por ultrassons (UAE), e tendo como variáveis relevantes tempo, temperatura (HAE) ou potência (UAE) e concentração de solvente. Para isso, foi aplicada uma metodologia de superfície de resposta, utilizando um desenho composto central circunscrito de três variáveis com cinco níveis, e os compostos antociânicos foram identificados e quantificados por HPLC-DAD-ESI/MS. A extração assistida por ultrassons foi o método mais eficaz, nas condições ótimas de $5,00 \pm 0,15$ min, $400,00 \pm 32,00$ W e $47,98 \pm 2,88\%$ de etanol (v/v), onde o rendimento de extração foi de $68,60 \pm 2,06\%$, com um teor total de antocianinas de $18,17 \pm 1,82$ mg/g de extrato e $11,76 \pm 0,82$ mg/g de epicarpo seco, originando um extrato de cor roxo-avermelhado. Além disso, estes valores de resposta foram ligeiramente melhorados quando se testou o efeito da relação sólido-líquido nas condições ótimas num formato dose-resposta, mostrando um padrão decrescente constante na faixa de 5 a 250 g/L.



Para além de estudar o potencial corante deste ingrediente natural, também se pretendeu avaliar o seu potencial funcional, para isso realizou-se uma avaliação das propriedades bioativas e efectuou-se um estudo de aplicação num produto alimentar do extrato obtido nas condições otimizadas. A avaliação das bioatividades foi realizada através da análise da capacidade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e citotóxica. O extrato apresentou uma atividade antioxidante considerável, com valores de EC_{50} de 204 ± 2 $\mu\text{g/mL}$ para o método de TBARS e EC_{50} de 296 ± 4 e 509 ± 3 $\mu\text{g/mL}$ para o método OxHLIA aos 60 e 120 min de reação, respetivamente. A capacidade antimicrobiana foi testada em 9 estirpes de bactérias de interesse na área da saúde, nas quais o extrato não apresentou efeito bactericida, mas teve a capacidade de inibir o crescimento bacteriano em concentrações de 2,5 a 20 mg/mL . A avaliação da atividade anti-inflamatória foi realizada em células de macrófagos de rato RAW 264.7 e a citotoxicidade foi testada em 4 linhas celulares tumorais humanas e numa cultura primária de células hepáticas não tumorais, para as quais o extrato não apresentou atividade, nem toxicidade.

O extrato corante foi incorporado em “beijinhos”, um produto de confeitaria típico brasileiro que tem como ingredientes básicos leite condensado, natas e manteiga, para avaliação da sua aplicabilidade numa matriz alimentar como corante alimentar. Foram determinados os parâmetros de cor, pH e textura, a composição nutricional e o valor energético das amostras de “beijinhos” logo após a sua confeção e depois de um dia de armazenamento. Em geral, o extrato otimizado incorporado revelou uma boa capacidade corante sem alterar as características nutricionais do produto alimentar. Com isto, foi possível evidenciar o potencial da exploração do epicarpo dos frutos de *P. spinosa* como fonte de antocianinas a serem utilizadas no setor alimentar, tendo como valor agregado ao poder corante, a sua capacidade bioativa.



ABSTRACT

Among organoleptic properties, colour plays a very important role in the overall perception of a foodstuff, since sight is usually the first contact that consumers have with the product. In this context, colorants have been widely used as food additives, to supply or intensify food colouring aspects, making them more attractive and pleasant. However, due to consumers' concerns about the health and adverse effects of some artificial colorants, there is a strong interest in replacing them with safer natural alternatives. Anthocyanins are a group of pigments with red, blue and violet coloration, being present in many flowers and fruits and increasingly considered as potential alternatives to artificial colorants.

Prunus spinosa L. is a wild shrub with bitter and astringent fruits that are poorly commercially exploited but have high levels of anthocyanins, more specifically cyanidin 3-rutinoside and peonidin 3-rutinoside, concentrated in the epicarp. The objective of this study was to develop a natural food colorant, from the extraction of anthocyanins from the fruit epicarps of *P. spinosa*, combining the growing interest of substituting artificial colorants for safer natural alternatives and the valorization of agricultural products from underexploited sources.

The conditions that maximize the extraction of anthocyanins from the fruit epicarp of *P. spinosa* were optimized, comparing two extractive techniques, one conventional heat-assisted (HAE) and another alternative ultrasound assisted extraction (UAE), testing as relevant variables time, temperature (HAE) or power (UAE), and solvent concentration. For that purpose, a response surface methodology was applied, using a circumscribed central composite design with three variables and five levels, and the anthocyanin compounds were identified and quantified by HPLC-DAD-ESI/MS. Ultrasound assisted extraction was the most efficient method, under optimum conditions of 5.00 ± 0.15 min, 400.00 ± 32.00 W and $47.98 \pm 2.88\%$ ethanol, where the extraction yield was $68.60 \pm 2.06\%$ (v/v), with a total anthocyanin content of 18.17 ± 1.82 mg/g of dry extract and 11.76 ± 0.82 mg/g of dry epicarp, which gives rise to a purple-reddish extract. Additionally, these response values were slightly improved when the solid-to-liquid ratio effect at the optimal conditions in a dose-response format was tested, showing a steady decreasing pattern in the range 5 to 250 g/L.

In addition to studying the colorant potential of this natural ingredient, it was also intended to evaluate its functional potential, for which an evaluation of the bioactive



properties was determined, and an application study was carried out using a food product incorporated with the extract obtained under optimized conditions

The evaluation of the bioactivities was carried out through analyzes of the antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and cytotoxic capacity. The extract presented a considerable antioxidant activity, with EC_{50} values of $204 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ for the TBARS assay and EC_{50} of 296 ± 4 and $509 \pm 3 \mu\text{g/mL}$ for OxHLIA method at 60 and 120 min of reaction, respectively. The antimicrobial capacity was tested in 9 strains of bacteria of interest in the health area, in which the extract did not present bactericidal effect, but all had their growth inhibited with an extract concentration between of 2.5 to 20 mg/mL. The anti-inflammatory activity was assessed on RAW 264.7 mouse macrophages and cytotoxicity was tested using 4 human tumor cell lines and on a primary culture of non-tumor liver cells, for which the extract showed no activity and no toxicity.

The dye extract was incorporated into "beijinhos", a typical brazilian confectionery product, that has as basic ingredients condensed milk, cream and butter, to evaluate its applicability as a natural colorant ingredient for a food matrix. The color, pH, and texture parameters, nutritional composition, and energetic value of "beijinhos" samples were determined after cooking and after one day of storage. In general, the incorporated optimized extract revealed a good coloring ability without altering the nutritional characteristics of the food product. With this, it was possible to evidence the potential exploitation of *P. spinosa* fruit epicarp as a source of anthocyanins to be used in the food industry, having as added value to the dye power, its bioactive capacity.



ÍNDICE

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
ÍNDICE	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE FIGURAS	xvii
1 Introdução	1
1.1 Aditivos alimentares.....	2
1.2 Corantes alimentares	4
1.2.1 Aspectos gerais	4
1.2.2 Corantes artificiais.....	5
1.2.3 Corantes naturais	8
1.3 Antocianinas como pigmentos naturais.....	11
1.3.1 Antocianinas.....	11
1.3.2 Principais fatores que afetam a cor e a estabilidade das antocianinas	13
1.3.2.1 pH.....	13
1.3.2.2 Temperatura	14
1.3.2.3 Luz.....	14
1.3.2.4 Copigmentação.....	15
1.3.3 Extração das antocianinas	15
1.4 <i>Prunus spinosa</i> L. como fonte de antocianinas.....	17
2 Objetivos.....	20
3 Materiais e Métodos.....	22
3.1 Material vegetal.....	23
3.2 Padrões e reagentes	23
3.3 Otimização do processo de obtenção de corante à base de antocianinas do epicarpo de frutos de <i>Prunus spinosa</i> L. comparando duas técnicas de extração	24
3.3.1 Procedimentos de extração para o epicarpo de frutos de <i>P. Spinosa</i>	24
3.3.1.1 Extração assistida por calor (HAE).....	24
3.3.1.2 Extração assistida por ultrassons (UAE).....	24
3.3.1.3 Processamento da amostra pós-extração	25



3.3.2	Identificação e quantificação de antocianinas por HPLC	25
3.3.3	Formatos dos valores de resposta para apresentação de resultados	26
3.3.4	Desenho experimental, análise de modelos e avaliação estatística	26
3.3.4.1	Desenho experimental RSM.....	26
3.3.4.2	Modelo matemático	26
3.3.4.3	Procedimento para otimizar as variáveis para uma resposta máxima	27
3.3.4.4	Análise dose-resposta da relação sólido-líquido	27
3.3.5	Métodos numéricos, análise estatística e ilustrações gráficas	27
3.4	Preparação de extrato corante à base de antocianinas do epicarpo de frutos de <i>Prunus spinosa</i> L., seguindo as condições ótimas, para estudos de bioatividade e de incorporação	28
3.5	Avaliação das propriedades bioativas do corante à base de antocianinas do epicarpo de frutos de <i>Prunus spinosa</i> L. obtido pelo processo de extração otimizado... ..	29
3.5.1	Atividade antioxidante	29
3.5.1.1	Inibição da peroxidação lipídica através de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	29
3.5.1.2	Inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA).....	29
3.5.2	Potencial citotóxico em células tumorais e não tumorais	30
3.5.3	Atividade anti-inflamatória	32
3.5.4	Atividade antimicrobiana	32
3.6	Estudo da incorporação do extrato corante à base de antocianinas do epicarpo de frutos de <i>Prunus spinosa</i> L. num produto de confeitaria	34
3.6.1	Preparação dos “beijinhos”	34
3.6.2	Avaliação dos parâmetros de cor, pH e textura das amostras de “beijinhos”. ..	34
3.6.3	Avaliação da composição nutricional e do valor energético das amostras de “beijinhos”.....	35
3.6.3.1	Açúcares livres	35
3.6.3.2	Ácidos gordos.....	36
3.6.4	Análise estatística dos parâmetros físico-químicos e reológicos dos “beijinhos”	37
4	Resultados e Discussão	38
4.1	Otimização do processo de obtenção de corante à base de antocianinas do epicarpo de frutos de <i>Prunus spinosa</i> L. comparando duas técnicas de extração	39
4.1.1	Aspectos gerais	39



4.1.2	Modelos de superfície de resposta teórica dos critérios de resposta utilizados para a análise de RSM e verificação estatística.....	40
4.1.3	Efeito das variáveis de extração nas respostas-alvo.....	50
4.1.4	Condições ótimas numéricas que maximizam a extração e verificação experimental de modelos de previsão	51
4.1.5	Análise de dose-resposta do efeito da relação sólido-líquido nas condições ótimas de extração.....	52
4.1.6	Comparação com outros estudos envolvendo a extração de antocianinas	55
4.2	Extrato corante à base de antocianinas do epicarpo de frutos de <i>Prunus spinosa</i> L., seguindo as condições ótimas, para estudos de bioatividade e de incorporação.....	56
4.3	Avaliação das propriedades bioativas do corante à base de antocianinas do epicarpo de frutos de <i>Prunus spinosa</i> L. obtido pelo processo de extração otimizado...	56
4.3.1	Atividade antioxidante	56
4.3.2	Atividade anti-inflamatória e citotóxica.....	58
4.3.3	Atividade antimicrobiana	59
4.4	Estudo da incorporação do extrato corante à base de antocianinas do epicarpo de frutos de <i>Prunus spinosa</i> L. num produto de confeitaria.	61
4.4.1	Aspectos gerais	61
4.4.2	Caracterização das diferentes formulações de “beijinhos”	61
4.4.2.1	Parâmetros nutricionais	62
4.4.2.2	Ácidos gordos.....	64
4.4.2.3	Parâmetros de cor	66
4.4.2.4	Parâmetros reológicos	66
5	Conclusões	69
	REFERÊNCIAS	72



LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
A	Absorvância do controlo
a*	verde/vermelho
AAPH	Dicloro-hidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)
AE	Extratos ricos em compostos fenólicos antociânicos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
B	Absorvância da solução com extrato
B	Valor paramétrico da interceção
b*	azul/amarelo
b₀	Coefficiente constante
b_i	Coefficiente de efeito linear
b_{ii}	Coefficiente de efeito quadrático
b_{ij}	Coefficiente de efeito de interação
C	Composto antociânico
C1	Cianidina 3-rutinósido
C2	Peonidina 3-rutinósido
CCCD	Desenho composto central circunscrito
CH₀	Densidade óptica da hemólise completa a 0 min
CNNPA	Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
CO₂	Dióxido de carbono
CT	Soma dos compostos cianidina 3-rutinósido e peonidina 3-rutinósido
D	Dimensão
DAD	Detector de diodos
DDA	Dose diária admissível
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
dw	Peso seco
E (código)	Europa
E (unidade)	Epicarpo
EC₅₀	Concentração de extrato que provoca 50% de inibição da produção de NO ou da peroxidação lipídica ou da hemólise oxidativa
ECACC	Coleção Europeia de Cultura Celular Animal
Eq.	Equação
ESI	Ionização de <i>electrospray</i>
f.m.	Matéria fresca
FAME	Ésteres metílicos de ácidos gordos
FBS	Soro fetal bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FID	Detetor de ionização de chama



fw	Peso fresco
g	Gramas
g	Força g (unidade de rotação)
GI₅₀	Concentração de extrato que inibe 50% da proliferação celular
GC	Cromatografia gasosa
h	Hora
HAE	Extração assistida por calor
HBSS	Solução salina balanceada de Hank
HCl	Ácido clorídrico
HCT-15	Linha celular humana de carcinoma de cólon
HeLa	Linha celular humana de carcinoma cervical
HepG2	Linha celular humana de carcinoma hepatocelular
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
Ht₅₀	Tempo hemolítico de 50%
IDA	Ingestão diária admissível
INT	Cloreto de <i>p</i> -iodonitrotetrazóico
kcal	Quilocaloria
kg	Quilograma
kHz	Quilo-Hertz
L	Litro
L*	Luminosidade
LPS	Lipopolissacarídeos
m	Valor paramétrico do declive
MCF-7	Linha celular humana de carcinoma mamário
MDA	Malondialdeído
mg	Miligramas
MHB	Caldo Mueller Hinton
MIB	Concentração mínima inibitória
MIC	Concentração mínima bactericida
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MS	<i>Mass spectrometry</i> – Espectrometria de massas
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
n	Número de variáveis
n°	Número
NaCl	Cloreto de sódio
NaNO₂	Nitrito de sódio
NCI – H460	Linha celular humana de carcinoma pulmonar
NED	Hidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina
nm	Nanometro
NO	Óxido nítrico



ns	Não significativo
OxHLIA	Ensaio da inibição da hemólise oxidativa
P ou X_2	Variável de potência de ultrassons
PBS	Tampão fosfato salino
PE	Extratos ricos em compostos fenólicos não-antociânicos
Pe	População de eritrócitos que permaneceu intacta
pf	Produto fresco
pH	Potencial de hidrogénio iónico
PLP2	Cultura primária de células de fígado de porco
q.s	<i>Quantum satis</i> – quanto basta
R	Resíduo do extrato
R²	Coefficiente de determinação
RAW 264.7	Linha de células macrófagas de rato
Re	Regulado
RI	Índice de refração
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio Instituto Memorial Parque Roswell
RSM	Metodologia de superfície de resposta
S ou X_3	Variável de percentagem de etanol no solvente
S/L ou X_4	Variável da relação sólido-líquido
S₀	Densidade ótica da amostra no tempo 0
SRB	Sulforodamina B
S_t	Densidade ótica da amostra no tempo t
t ou X_1	Variável de tempo
T ou X_2	Variável de temperatura
T0	Dia da preparação
T1	Dia posterior ao da preparação
TBARS	Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TFA	Ácido trifluoroacético
TR	Tempo de retenção
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
TSB	Caldo tripton de soja
U	Unidade de massa atômica
UAE	Extração assistida por ultrassons
UE	União Européia
UFC	Unidade formadora de colónia
UV	Ultravioleta
v	Volume
var.	Variedade
W	Watt
X_i e X_j	Variáveis independentes
Y	Formato de resposta
Y_1	Rendimento do composto por resíduo extraído (mg C/g R)



Desenvolvimento de um corante alimentar natural à base de antocianinas obtido a partir do epicarpo de frutos de *Prunus spinosa* L.: otimização da extração e estudo de aplicação

Y_2	Rendimento do composto por epicarpo seco (mg C/g E dw)
α	Nível de significância
Δt	Tempo de atraso da hemólise



LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Corantes artificiais e seus efeitos adversos.	7
Tabela 2: Corantes naturais autorizados na União Europeia.....	9
Tabela 3: Grupos de corantes naturais.....	10
Tabela 4: Resultados experimentais de RSM do CCCD para a otimização das três principais variáveis envolvidas (X_1 , X_2 e X_3) na HAE e na UAE para os três formatos de valores de resposta avaliados (Y_1 , mg C/g R; Y_2 , mg C/g E dw e <i>Rendimento</i> , %). Descrição de variáveis, valores naturais e intervalos. Três repetições foram realizadas para cada condição e para cada técnica.	44
Tabela 5: Resultados paramétricos da equação polinomial de segunda ordem da Eq. (1) para as técnicas de HAE e UAE avaliadas e em termos do comportamento de extração dos três formatos de valores de resposta (Y_1 , mg C/g R; Y_2 , mg C/g E dw e <i>Rendimento</i> , %), de acordo com o CCCD com 5 níveis (Tabela 4). O subscrito paramétrico 1, 2 e 3 representa as variáveis envolvidas t (X_1), T ou P (X_2) e S (X_3), respetivamente. A análise de significância dos parâmetros ($\alpha = 0,05$) é apresentada em valores codificados. Além disso, é apresentada a informação estatística do procedimento de adaptação ao modelo.	45
Tabela 6: Modelos matemáticos do processo de extração derivados do modelo polinomial de segunda ordem com interação descrita na Eq. (1) em termos dos valores codificados.....	46
Tabela 7: Condições das variáveis em valores naturais que levam a valores ótimos de resposta para RSM usando um CCCD para cada uma das técnicas de extração avaliadas (HAE e UAE), para os três formatos de valores de resposta (Y_1 , mg C/g R; Y_2 , mg C/g E dw; e <i>Rendimento</i> , %) para cada composto avaliado (C1 e C2) e para o total de compostos (CT = C1 + C2).....	47
Tabela 8: Quantidade de antocianinas (cianidina 3-rutinósido e peonidina 3-rutinósido) no resíduo e parâmetros de cor do extrato obtido nas condições ótimas (média \pm desvio padrão).....	56
Tabela 9: Atividade antioxidante do extrato do epicarpo do fruto de <i>P. spinosa</i> (média \pm desvio padrão).	58
Tabela 10: Atividade antimicrobiana do extrato do epicarpo de frutos de <i>P. spinosa</i> e controlos positivos contra isolados clínicos selecionados (valores em mg/mL).	60
Tabela 11: Composição nutricional, açúcares livres (g/100 g pf) e valor energético (kcal/100 g pf) das diferentes formulações de “beijinho”.	63
Tabela 12: Composição em ácidos gordos (%) das diferentes formulações de beijinho (média \pm desvio-padrão).....	65
Tabela 13: Parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) e pH nas diferentes formulações de beijinho.	66
Tabela 14: Parâmetros reológicos nas diferentes formulações de “beijinho”.	68



LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Percentagem de uso de corantes em alimentos e bebidas.....	8
Figura 2: Estruturas, nomes e fontes na natureza das principais antocianidinas.....	12
Figura 3: Estruturas químicas de antocianinas em meio aquoso.....	14
Figura 4: Frutos de <i>Prunus spinosa</i> L.	18
Figura 5: Representação do perfil cromatográfico dos compostos cianidina 3-rutinósido e peonidina 3-rutinósido do extrato do epicarpo dos frutos de <i>P. spinosa</i> , obtido por HPLC-DAD a 520 nm. O tempo de retenção (TR) é apresentado junto ao pico.	41
Figura 6: Diagrama das diferentes etapas executadas para otimizar as condições que maximizam as respostas de extração (Y_1 , mg C/g R e Y_2 , mg C/g E dw) de antocianinas e o resíduo total extraído (<i>Rendimento</i> , %).	43
Figura 7: Mostra os resultados gráficos do HAE e UAE para o rendimento de extração do material residual obtido e o total de antocianinas detectados em termos de dois formatos de resposta (Y_1 , mg C/g R e Y_2 , mg C/g E dw). Cada figura é dividida em duas partes. Parte A: Mostra a análise gráfica por superfícies de rede que representa a superfície de resposta 3D prevista com o polinómio de segunda ordem da Eq. (1). As ações binárias entre as variáveis são apresentadas quando a variável excluída é posicionada no ótimo individual (Tabela 7). Parte B: ilustra a adequação do ajuste, sendo usados dois critérios gráficos básicos de estatística. O primeiro é a capacidade de simular as mudanças da resposta entre os dados previstos e observados; e o segundo, a distribuição residual em função de cada uma das variáveis.....	48
Figura 8: Mostra as projeções de isolinhas otimizadas para a extração de C1 e C2 em função da combinação das três principais variáveis envolvidas (X_1 , X_2 e X_3) na HAE e UAE. Para cada composto, os dois formatos de valores de resposta (Y_1 , mg C/g R e Y_2 , mg C/g E dw) são apresentados para descrever visualmente as tendências de cada resposta e guiar a seleção das condições mais favoráveis, considerando simultaneamente todas as respostas. Adicionalmente, apresentam-se as projeções de isolinhas do rendimento do material residual extraído. Cada um dos gráficos de contorno representa a projeção no plano XY da superfície de resposta tridimensional teórica prevista com o polinómio de segunda ordem da Eq. (1). As ações binárias entre as variáveis são apresentadas quando a variável excluída é posicionada no ótimo individual (Tabela 7).	49
Figura 9: Resumo final dos efeitos de todas as variáveis avaliadas para os sistemas HAE e UAE. Parte A: Mostra as respostas 2D individuais de todas as respostas estudadas em função de todas as variáveis avaliadas. As variáveis em cada um dos gráficos 2D foram posicionadas nos valores ótimos individuais das restantes (Tabela 5). Os pontos (○) apresentados ao longo de cada linha destacam a localização do valor ótimo. Linhas e pontos são gerados pelo polinómio teórico de segunda ordem (Tabela 6). Parte B: Mostra a resposta à dose de S/L nos valores ótimos globais das outras três variáveis (Tabela 7). Os resultados experimentais são os pontos (○), enquanto as linhas são o padrão previsto pela Eq. (2). O valor limite (~ 250 g/L) mostra a concentração experimental máxima alcançada até que a amostra não possa ser fisicamente agitada em escala laboratorial.	53
Figura 10: Diferentes formulações de “beijinhos”. BA0 – “beijinhos” com a incorporação do extrato corante obtido do epicarpo de frutos de <i>P. spinosa</i> ; BB0 – controlo, sem adição de corante.	62



1 Introdução



1.1 Aditivos alimentares

Ao longo das últimas décadas tem-se assistido a um aumento gradual da procura de alimentos diferenciados e, juntamente, cresceu a exigência por parte dos consumidores em relação à qualidade sensorial, organolética e sanitária dos mesmos (Martins, Roriz, Morales, Barros, & Ferreira, 2016). Proporcionar alimentos de rápido acesso e fácil preparação, com tempo de prateleira extensa, mantendo as suas qualidades nutricionais e microbiológicas e que agradem ao paladar do consumidor, é um desafio diário para o setor alimentar. Frente a esta necessidade, as indústrias alimentares aliadas à ciência estudam, desenvolvem e aplicam recursos para otimizar processos, minimizar custos, possibilitar operações, desenvolver ou melhorar produtos (DeMan, 1999).

Nem sempre os métodos tradicionais como o congelamento, desidratação, aplicação de salmoura, ou pasteurização, entre outros, são suficientes. Para atingir certos objetivos, a indústria alimentar utiliza compostos químicos que atuam de alguma forma sobre o alimento, denominados aditivos químicos. Estes são substâncias que se adicionam aos alimentos a fim de contribuírem de forma tecnológica ou fisiológica (Belitz & Grosch, 1997), objetivando-se agregar valor organolético ou sensorial, aumentar ou manter a qualidade microbiológica, ou auxiliar no aumento do tempo de vida útil dos mesmos. Entre os propósitos para adição dos aditivos estão: i) melhorar a qualidade do alimento e/ou manter essa qualidade por mais tempo; ii) aumentar a aceitabilidade por parte do consumidor e iii) tornar o alimento mais acessível e fácil de preparar (DeMan, 1999).

O *Codex Alimentarius* (1995), o ponto internacional de referência mais importante de todas as normas alimentares, traz como definição de aditivo alimentar “qualquer substância que normalmente não se consome como alimento por si mesmo nem é usado normalmente como um ingrediente típico, tendo ou não valor nutritivo, e que se adicione de forma intencional aos alimentos com fins tecnológicos (incluindo os organoléticos) na fabricação, elaboração, preparação, tratamento, envase, embalagem, transporte e armazenamento, de maneira que se possa esperar razoavelmente que, direta ou indiretamente, por si mesmo ou seus subprodutos se convertam em um componente, ou que afete de algum modo as características desse alimento. O termo não inclui substâncias adicionadas ao alimento para manter ou melhorar suas qualidades nutricionais”.

Os aditivos alimentares supracitados referem-se aos compostos químicos adicionados de forma intencional ao alimento, caso contrário são tratados como ingredientes ou contaminantes. Estas substâncias permanecem no alimento na forma original ou originam compostos derivados. Quando desaparecem durante o percurso do



processo são classificadas como coadjuvante tecnológico (Escudero-Gilete & Romero, 2017).

Como os aditivos alimentares são um grupo de substâncias muito heterogêneo e complexo, a sua classificação é feita tendo em consideração diversos critérios nomeadamente, a sua função, origem e estrutura química, entre outros.

De acordo com a sua função, estas substâncias podem ser classificadas como: agentes conservantes, acidificantes, emulsionantes, estabilizantes, espessantes, humidificantes, anti-humidificantes, corantes, aromatizantes e edulcorantes (Aun et al., 2011). Dentro da União Europeia (UE), conforme o Regulamento (CE) n° 1333/2008 (2008), os aditivos alimentares são divididos em 26 classes, dependendo da sua função nos alimentos. Por sua vez, a FDA (*Food and Drug Administration*), nos Estados Unidos, divide os aditivos em apenas 6 grupos, permitindo que uma mesma substância seja mencionada em duas ou mais classes (Carocho, Barreiro, Morales, & Ferreira, 2014).

A utilização destes compostos químicos é, no entanto, controlada por regulamentos e leis conforme o país onde os produtos são fabricados e/ou comercializados. Estas definem quais e a quantidade em que estes compostos podem ser adicionados aos alimentos. Isto porque, certos aditivos podem apresentar potencial carcinogénico, toxicidade, causar possíveis alergias, entre outras reações adversas à saúde, quando utilizados de formas indevidas no alimento, tanto por uso excessivo, como pela adição de um ingrediente não declarado.

Em Portugal, a lista dos aditivos e as condições de utilização permitidas encontram-se no Regulamento (UE) n° 1129/2011 (2011). Neste regulamento encontram-se ainda os códigos que correspondem a cada aditivo alimentar, sendo constituídos pela letra E (de Europa) seguida de 3 ou 4 algarismos, válidos em todos os países da UE. No Brasil, os corantes são regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução – CNNPA n° 44 de 1977 (Brasil, 1978).

São diversas as razões para a utilização de aditivos alimentares, tanto para satisfazer as necessidades do consumidor como também as das indústrias (Escudero-Gilete & Romero, 2017), entre elas estão razões económicas, tecnológicas e de aspeto psicológico. Através da utilização destes componentes é possível aumentar o tempo de vida útil dos produtos, favorecendo maiores volumes de produção, armazenamento e distribuição, torná-los mais atrativos quanto aos aspetos sensoriais e otimizar ou promover processos de obtenção.



1.2 Corantes alimentares

1.2.1 Aspectos gerais

A percepção da cor resulta de um conjunto de sensações decorrentes da atividade da retina do olho (DeMan, 1999), sendo uma resposta mental ao estímulo que uma radiação luminosa visível produz na retina, relacionando aspectos fisiológicos e psicológicos (Escudero-Gilete & Romero, 2017).

Analisando as características sensoriais de um alimento, como a textura e o sabor, a cor também é um recurso sensorial muito importante e influente na aceitação global de um alimento, sendo o primeiro contacto que o consumidor tem com o produto. Ciente disso, a indústria alimentar utiliza essa característica sensorial para atender expectativas do consumidor, através da coloração e obtenção de alimentos visualmente agradáveis (Souza, 2012).

A coloração observada nos alimentos pode ser proveniente da presença natural de pigmentos corantes, como carotenoides, antocianinas e clorofilas, da formação de pigmentos corantes através de reações químicas ou enzimáticas, pela adição de corantes naturais ou artificiais durante o processamento, ou simplesmente por efeito físico de dispersão de luz no alimento (Escudero-Gilete & Romero, 2017).

Conforme o artigo 8º do Regulamento (CE) nº 1333/2008 (2008), os corantes (naturais ou artificiais) adicionados intencionalmente aos alimentos são substâncias que possuem como função: corrigir a coloração original do produto alimentar afetada pelo processamento, armazenamento, embalagem ou distribuição, tornar o produto visualmente mais atrativo ou conferir cor.

Entende-se como corantes naturais aqueles obtidos de matrizes naturais (vegetais, ou eventualmente, animais), ou pela síntese de compostos que tenham estrutura química homóloga ao natural. Os corantes artificiais, por sua vez, são obtidos por síntese química não possuindo semelhante na natureza (Escudero-Gilete & Romero, 2017).

A potencial utilização destes compostos corantes pela indústria alimentar associa-se à procura do consumidor por alimentos atrativos e apetitosos, mas, em contrapartida, observa-se uma grande atenção em relação aos seus efeitos na saúde. Com os crescentes estudos acerca do assunto, tem-se relacionado cada vez mais os corantes artificiais a alguns efeitos colaterais, como sinais de toxicidade e efeitos cancerígenos (Martins et al., 2016). Por outro lado, os corantes naturais já aprovados têm-se revelado mais benéficos



e seguros para a saúde, contribuindo com propriedades funcionais, além da sua função principal de conferir características organolépticas (Carocho, Morales, & Ferreira, 2015).

Portanto, apesar dos corantes artificiais apresentarem menores custos de produção e maior estabilidade, o número de aditivos artificiais permitidos e a sua utilização estão a diminuir a cada ano, em favor das alternativas naturais (Martins et al., 2016).

1.2.2 Corantes artificiais

A toxicidade associada a efeitos mutagénicos, teratogénicos e carcinogénicos e a capacidade de causar reações alérgicas ou adversas ao organismo, tem que ser escrupulosamente estudada em processos de aprovação de um novo aditivo ou ampliação do uso de algum aditivo dentro da UE (Carocho et al., 2014). Com base em estudos como estes é que se pode determinar se a ingestão da substância é segura e quais as quantidades que podem ser incorporadas no produto. Perante um conjunto de dados toxicológicos sobre uma determinada substância pode-se, por exemplo, definir a dose diária admissível (DDA), também denominada por ingestão diária admissível (IDA). A DDA é expressa em mg/kg de massa corporal, correspondendo à quantidade da substância que pode ser ingerida diariamente por um indivíduo durante toda a sua vida, sem causar danos à sua saúde.

Este índice é utilizado pelo Regulamento (UE) n^o 1129/2011 (2011), bem como em diversos outros países, como parâmetro de limite de adição de corantes e demais aditivos nos produtos alimentares. Quando não existir uma dose recomendada é utilizado o termo “*Quantum satis*” indicando que não há especificação de teor numérico máximo, devendo-se utilizar então quantidades mínimas necessárias, conforme boas práticas de fabricação.

No entanto, as opiniões quanto à inocuidade dos diversos corantes artificiais são muito divergentes. A lista de substâncias corantes permitidas e os valores de IDA diferem muito entre vários países. Isto demonstra o quanto os estudos sobre os efeitos nocivos à saúde provocados pelos corantes artificiais são contraditórios e insuficientes (Prado & Godoy, 2003).

Na UE, existem dezassete tipos de corantes artificiais que são permitidos, seis dos quais que se encontram destacados no Anexo V do Regulamento (CE) n^o 1333/2008 (2008): amarelo-sol (E 110), amarelo de quinoleína (E 104), carmosina/azorubina (E



122), vermelho allura (E 129), tartarazina (E 102) e ponceau 4R (E 124). Isto porque a sua utilização é restrita à seguinte condição: toda comida ou bebida que contenha qualquer uma destas substâncias deve conter no seu rótulo uma informação que apresente o nome ou número do(s) corante(s) seguido da frase “pode causar efeitos negativos na atividade e na atenção das crianças”.

Destes seis corantes, a utilização do amarelo de quinoleína (E 104) é proibido em alimentos produzidos no Brasil (Brasil, 1978) e também nos Estados Unidos (Escudero-Gilete & Romero, 2017). O amaranto (E 123) é permitido tanto no Brasil quanto na UE, mas é proibido em países como Estados Unidos, Noruega, Rússia e Áustria (Brasil, 2017). Já o FD&C green n° 3¹, o citrus red n° 2 (E 121), o gluconato ferroso (E 579) e o orange B¹, são exemplos de alguns corantes que são permitidos nos Estados Unidos mas proibidos na União Europeia (Escudero-Gilete & Romero, 2017).

Segundo dados da Anvisa (Brasil, 2017), o amaranto (E 123), também denominado de bordeau S, “pode causar asma, eczema, hiperatividade, reações alérgicas e/ou intolerância, urticária, especialmente em indivíduos com intolerância à aspirina ou asmáticos”. Este corante vermelho possui um IDA de 0,5 mg/kg de massa corporal, sendo comumente utilizado em doces, geleias, gelados, recheios entre outros.

O amarelo tartarazina (E 102) é um derivado nitroso causador de reações alérgicas como asma e urticárias e, além disso, tem sido alvo de estudos de efeitos na mutagênese e carcinogênese. Em estudos efetuados *in vivo*, foi observado um aumento considerável na produção de linfócitos e eosinófilos na mucosa do antro gástrico de ratos. Este corante é também muito associado a reações alérgicas como asma e urticária (Moutinho, Bertges, & Assis, 2007).

Em ensaios com coelhos (Yamazaki et al., 1994; Yamazaki, Akieda, Tanaka, Yokoi, & Yamaguchi, 1997), observou-se que alguns corantes vermelhos e amarelos utilizados no Japão podem interferir na coagulação sanguínea, e que os amarelos, tais como tartarazina (E 102) e amarelo crepúsculo (E 110), podem ainda inibir a síntese do tromboxano. Na **Tabela 1** estão exemplificados efeitos adversos associados aos corantes artificiais amplamente utilizados.

Efetivamente, alguns corantes artificiais têm sido associados a efeitos maléficos na saúde desde urticárias, asma, reações imunológicas, e até mesmo cancro. No entanto, são poucos os dados científicos que conseguem comprovar estas correlações,

¹ Não possuem código E



principalmente tratando-se de efeitos a médio e longo prazo. De realçar que os corantes artificiais continuam a ser amplamente utilizados.

Tabela 1: Corantes artificiais e seus efeitos adversos.

Corante	Origem	Aplicação	Efeitos adversos
Amarelo crepúsculo (E 110)	Sintetizado a partir da tinta do alcatrão de carvão e tintas azoicas.	Cereais, rebuçados, caramelos, coberturas, xaropes, laticínios.	A tinta azoica, em algumas pessoas, causa alergia, produzindo urticária, angioedema e problemas gástricos.
Vermelho Ponceau 4R (E 124)	Tinta do alcatrão de carvão.	Frutas em caldas, laticínios, xaropes de bebidas, rebuçados, cereais, refrescos e refrigerantes, sobremesas.	Deve ser evitado por pessoas sensíveis à aspirina e asmáticos. Podem causar anemia e aumento da incidência de glomerulonefrite (doença renal).
Azul Brillhante (E 133)	Sintetizado a partir da tinta do alcatrão de carvão.	Laticínios, rebuçados, cereais, queijos, recheios, gelatinas, licores, refrescos.	Pode causar hiperatividade em crianças, eczema e asma. Deve ser evitado por pessoas sensíveis às purinas.
Vermelho Eritrosina (E 127)	Tinta do alcatrão de carvão.	Pós para gelatinas, laticínios, refrescos, geleias.	Pode ser fototóxico. Contém 557 mg de iodo por grama de produto. Consumo excessivo pode causar aumento de hormona tireoidiano no sangue em níveis para ocasionar hipertireoidismo.
Indigotina (azul escuro) (E 132)	Tinta do alcatrão de carvão.	Goma de mascar, iogurte, rebuçados, caramelos, pós para refrescos artificiais.	Pode causar náuseas, vômitos, hipertensão e ocasionalmente alergia, com prurido e problemas respiratórios.
Vermelho 40 (E 129)	Sintetizado quimicamente.	Alimentos à base de cereais, rebuçados, laticínios, recheios, sobremesas, xaropes para refrescos, refrigerantes, geleias.	Pode causar hiperatividade em crianças, eczema e dificuldades respiratórias.

Adaptado de: Souza, 2012.

Na **Figura 1** está representada a aplicação de corantes artificiais na indústria alimentar e de bebidas. Isto porque os corantes artificiais ainda apresentam vantagens frente aos naturais como facilidade de produção, melhor estabilidade (frente a fatores como luz, oxigénio, pH e calor), custos mais baixos e melhores propriedades corantes.



Além disso, podem apresentar grande pureza e grande capacidade de coloração, com uma gama mais ampla de tonalidades e de maior uniformidade e reprodutibilidade na produção (Escudero-Gilete & Romero, 2017).

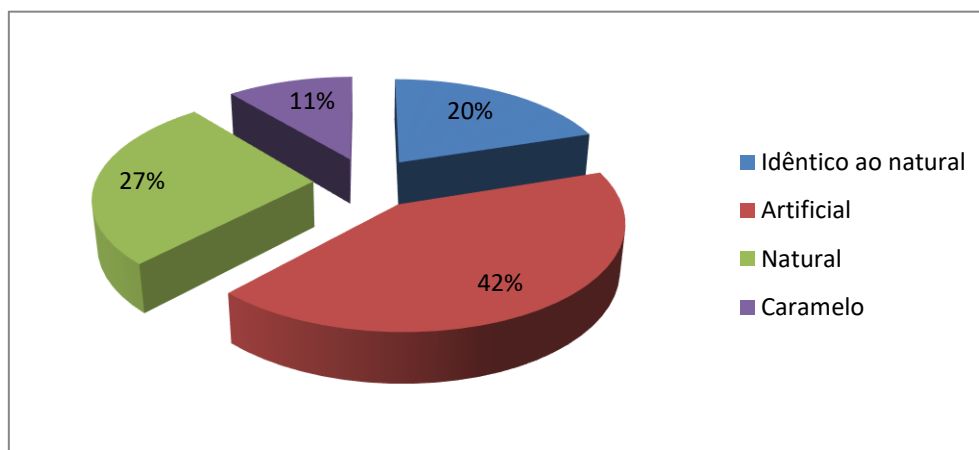


Figura 1: Percentagem de uso de corantes em alimentos e bebidas. Adaptado: Downham & Collins, 2000.

1.2.3 Corantes naturais

Os corantes naturais são obtidos por extração seletiva de materiais naturais, sendo todos de origem vegetal ou mineral – com exceção do carmim de cochonilha (*Dactylopius coccus*). Apesar de apresentarem maiores custos de produção e menor estabilidade frente aos artificiais, os corantes naturais conquistam a cada ano mais espaço no mercado alimentar. Estima-se um crescimento anual de 5 a 10%, contra 2 a 5% dos artificiais (Shiozer & Barata, 2007). Um dos fatores de maior interesse são os aspetos relacionados com a saúde, pois os corantes naturais são considerados geralmente como inócuos, e as limitações específicas de sua utilização são menores do que as que afetam os corantes artificiais. Na **Tabela 2** são apresentados os corantes de origem natural autorizados pela UE, com os seus respetivos valores de IDA e as condições de dosagem.



Tabela 2: Corantes naturais autorizados na União Europeia.

N.º E	Denominação	Tonalidade	IDA (mg/kg*/d)	Dose máxima
E 100	Curcumina A	Amarelo- Laranja	3	R
E 101	Riboflavina, lactoflavina (i) Riboflavin-5'-fosfato (ii)	Amarelo- Laranja	0,5	<i>q.s</i>
E 120	Cochonilha, ácido carmínico, carminas	Vermelho	2,5	R
E 140	Clorofilas (i) e clorofilinas (ii)	Verde	–	<i>q.s</i>
E 141	Complexos cúpricos de clorofilas (i) e clorofilinas (ii)	Verde	15	<i>q.s</i>
E150a	Caramelo simples	Castanho		
E 150b	Caramelo sulfítico cáustico	Castanho	300**	<i>q.s</i>
E 150c	Caramelo de amónia	Castanho		
E 150d	Caramelo sulfítico de amónia	Castanho		
E 153	Carvão vegetal	Preto	–	<i>q.s</i>
E 160 ^a	Carotenos	Amarelo- Laranja	5	<i>q.s</i>
E 160b	Anato, bixina, norbixina	Laranja	0,065	R
E 160c	Extrato de pimentão, capsantina, capsorubina	Vermelho	–	<i>q.s</i>
E 160d	Licopeno	Vermelho	0,5	R
E 160e	Beta-apo-8'-carotenal (C 30)	Laranja- Avermelhado- Amarelo	0,03	<i>q.s</i>
E 161b	Luteína	Laranja- Avermelhado- Amarelo	–	R
E 161g	Cantaxantina	Violeta	0,03	R
E 162	Vermelho de beterraba, betaína	Vermelho	–	<i>q.s</i>
E 163	Antocianinas	Depende do pH (de vermelho a violeta)	–	<i>q.s</i>
E 170	Carbonato de cálcio	Branco	–	<i>q.s</i>
E 171	Dióxido de titânio	Branco	–	<i>q.s</i>
E 172	Óxidos e hidróxidos de ferro	Castanho	–	<i>q.s</i>
E 173	Alumínio	Prateado a cinza	–	R
E 174	Prata	Prateado	–	R
E 175	Ouro	Dourado	–	R

Legenda: *Kg de massa corporal; –Sem IDA estabelecida; *q.s*: *quantum satis*; R: regulado;
**IDA E 150c 100 mg/kg/d. Adaptado de: Escudero-Gilete & Romero, 2017



Os corantes naturais podem ser classificados num reduzido número de classes estruturais principais. A **Tabela 3** apresenta uma lista dos corantes, excluindo os raros ou de ocorrência restrita.

Tabela 3: Grupos de corantes naturais.

Grupo	Nome Alternativo	Classes de Pigmentos	Cores Predominantes
Tetrapirróis	Porfirina	Clorofilas	Verde
		Hemes	Vermelho
		Biliproteínas	Azul-verde-amarelo-vermelho
Tetraterpenos	Carotenoides	Carotenos	Amarelo-vermelho
		Xantofilas	Amarelo
O-Heterocíclicos	Flavonoides	Antocianinas	Azul-vermelho
		Flavonóis	Amarelo-branco
		Flavonas	Branco-creme
Quinonas	Outros compostos fenólicos e derivados	Naftoquinonas	Vermelho-azul-verde
		Antraquinonas	Vermelho-roxo
		Alo-melaninas	Amarelo-castanho
		Taninos	Castanho a vermelho
N-heterocíclicos	Indigóides e Pirimidinas	Betalainas	Amarelo-vermelho
		Indigóides	Azul-rosa
		Purinas	Branco opaco
		Pteridinas	Branco-amarelo
		Flavinas	Amarelo

Adaptado de: Houghton & Hendry, 2012

Cada vez mais os corantes alimentares naturais estão associados a benefícios funcionais e a efeitos de melhoria na saúde humana, demonstrando-se mais seguros, específicos e ausentes de efeitos colaterais e toxicidade (Carocho et al., 2015). Além de melhorar a aparência visual do produto, estes corantes podem exercer funções adicionais no alimento, de forma a trazer efeitos benéficos para a saúde do consumidor.

Os carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) demonstraram ter efeito antioxidante em produtos de origem animal (Garcia, Bolognesi, Dias, Miguel, & Costa, 2012). Por possuírem uma extensa cadeia de ligações duplas na sua estrutura, estes compostos permitem a adição de radicais livres aos carbonos adjacentes às insaturações. Essa interação reduz a concentração de oxigénio no meio, reduzindo a produção do radical peróxido formada, inibindo assim a auto-oxidação.



Já as clorofilas apresentam efeito antimutagénico e antígenotóxico; estes compostos são capazes de proteger as células contra processos oxidativos e contra a iniciação e progressão do cancro, de forma a melhorar a capacidade de linfócitos humanos em resistir aos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogénio (H_2O_2), procedendo assim como um anti-inflamatório e antioxidante (Souza, 2012).

Escudero-Gilete & Romero (2017) afirmaram que o consumo elevado de licopeno está associado a uma redução da incidência do cancro de próstata, e que o consumo de antocianinas possui efeito anti-inflamatório e anticarcinogénico, reduzindo a incidência de doenças cardiovasculares. Houghton & Hendry (2012) citam mais propriedades deste tipo de corantes naturais. De realçar que os carotenoides são benéficos contra doenças coronárias e, em particular, o β -caroteno além de vitamínico, atua contra o cancro do pulmão e o licopeno é benéfico nos cancros do aparelho digestivo.

No entanto, para se obter a coloração desejada e a permanência no alimento por determinado tempo, é necessária certa atenção na utilização destes corantes. Por se tratar de um grupo diversificado, os corantes apresentam características de solubilidade e estabilidade amplamente diferenciadas e, portanto, devem ser avaliadas e correlacionadas com as características do alimento em que serão aplicados e com as condições tecnológicas. Entre os fatores que afetam a escolha da cor está a solubilidade da substância, a sua forma física, o pH, a qualidade microbiológica e a presença de outros ingredientes. A solubilidade relaciona-se com a polaridade das moléculas, sendo, por exemplo, as antocianinas solúveis em água e as clorofilas solúveis em óleo. Os corantes podem ser encontrados na forma líquida, em pó, pasta e suspensão, sendo a sua dissolução influenciada pela temperatura, que pode resultar numa mudança de cor (Houghton & Hendry, 2012).

1.3 Antocianinas como pigmentos naturais

1.3.1 Antocianinas

As antocianinas são pigmentos hidrossolúveis apresentando uma gama de cores entre o vermelho, azul e violeta, estando presentes em vários frutos e vegetais (Hernández-Herrero & Frutos, 2011). São muitas as fontes onde podem ser encontradas, incluindo uva, morango, figo e beringela, por exemplo (**Figura 2**).



Os extratos antociânicos estão a ser cada vez mais difundidos na Europa, devido aos seus diversos benefícios fisiológicos, incluindo efeitos contra doenças cardiovasculares, aterosclerose e cancro, efeito antioxidante sobre lípidos e redução do nível de colesterol (Olivas-Aguirre et al., 2016).

Podem ser encontrados na natureza cerca de 300 compostos antociânicos estruturalmente e espectralmente distintos. Pertencem ao grupo dos compostos fenólicos e à classe dos flavonoides; quimicamente são glucósidos de antocianidinas (aglicona), tendo como estrutura base o catião flavílico ou 2-fenilbenzopirilo (estrutura policíclica de 15 carbonos). Diferem entre si pelo número de grupos hidroxilo e/ou metílico presentes na aglicona, pela natureza, número e posição dos açúcares e de ácidos alifáticos ou aromáticos ligados à molécula de açúcar, sendo os principais açúcares ligados às antocianidinas a glucose, arabinose, galactose e rarnose (Constant, Stringheta, & Sandi, 2002). São conhecidas até 20 estruturas diferentes de antocianidinas, mas as mais comuns nas plantas e, portanto, as que apresentam maior interesse são a pelargonidina (cor laranja), cianidina (cor laranja-vermelho), peonidina (cor laranja-vermelho), delphinidina (cor azul-vermelho), petunidina (cor azul-vermelho) e malvidina (cor azul-vermelho) (**Figura 2**).

Estrutura do catião flavílico	Estrutura do Anel B	Nome	Encontrado em
		Pelargonidina	Morango, amora vermelha
		Cianidina	Jaboticaba, figo, ameixa, amora, repolho roxo.
		Delphinidina	Berinjela, romã e maracujá.
		Malvidina	Uva, feijão.
		Peonidina	Uva, cereja.
		Petunidina	Frutas diversas, petúnias.

Figura 2: Estruturas, nomes e fontes na natureza das principais antocianidinas. Adaptado de: Souza, 2012.

As antocianinas compõem o maior grupo de corantes hidrossolúveis do reino vegetal e, quando em solução aquosa, encontram-se na forma de uma mistura de



diferentes estruturas químicas em equilíbrio: catião flavílico (vermelho), base anidra quinoidal (azul, oxidação de um dos hidroxilos em cetona), pseudobase carbinol (incolor, hidratação da estrutura) e pseudobase chalcona (incolor ou levemente amarela, ocorre hidrólise do éter, deixando uma corrente aberta) (Lopes, Xavier, Gabriela, Quadri, & Quadri, 2007).

1.3.2 Principais fatores que afetam a cor e a estabilidade das antocianinas

Assim como na maioria dos corantes naturais, a estabilidade das antocianinas pode ser afetada por diversos fatores, podendo ocorrer a sua degradação durante os processos de extração/purificação e processamento e armazenamento de alimentos. Desta forma, é importante conhecer a influência destes fatores nos mecanismos de degradação destas moléculas, de forma a obter processos de extração/purificação eficientes na utilização deste grupo de corantes.

1.3.2.1 *pH*

O pH é certamente o parâmetro de maior importância em relação à coloração das antocianinas, visto que a cor destas moléculas é dependente do pH que sofrem transformações reversíveis com as variações deste fator (Constant et al., 2002).

As antocianinas apresentam maior estabilidade em pH ácido, e conforme ocorre o aumento do pH, a natureza iônica das antocianinas promove mudanças na sua estrutura molecular, resultando em diferentes cores. O catião flavílico é a espécie mais estável e colorida, sendo a única encontrada significativamente em meio muito ácido (pH 0,5). Conforme o aumento do pH, pode ocorrer uma série de reações químicas: hidratação, tautomerização, transferências de prótons e isomerização. Ao elevar-se o pH, o catião flavílico sofre um ataque nucleofílico da água, sendo hidratado para formar a pseudobase carbinol, que é incolor, ou então perde prótons formando a base anidra quinoidal, de coloração azul, em menores concentrações. Para valores de pH muito superiores, o anel carbinol abre formando-se a pseudobase chalcona, de cor amarela. Esta pode-se encontrar nas formas *cis* e *trans* pela isomerização. Logo, a variação da coloração ou perda de cor das antocianinas é dependente do equilíbrio entre as quatro espécies em solução (**Figura 3**), conforme o valor do pH (Maia, 2013; Moreira, 2007).

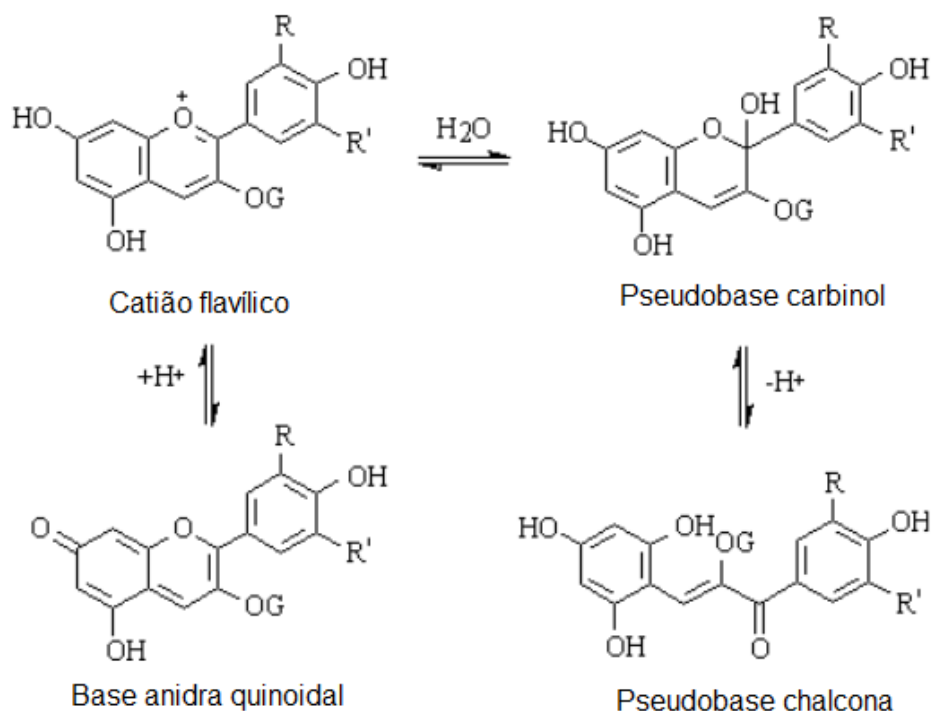


Figura 3: Estruturas químicas de antocianinas em meio aquoso. Adaptado de: (Constant et al., 2002).

1.3.2.2 Temperatura

Assim como na maioria das reações químicas, a estabilidade e a degradação das antocianinas é influenciada pela temperatura. À medida que as soluções de antocianinas são submetidas a temperaturas superiores à temperatura ambiente (25 °C), maior será a sua degradação (Lopes et al., 2007).

Cacace & Mazza (2003) realizaram estudos de extração de antocianinas de groselhas pretas utilizando como solventes o etanol e água acidificada com ácido sulfúrico. Nesse estudo, verificaram que com o aumento da temperatura de 6 para 30 °C aumentou o rendimento de extração e reduziu o tempo de extração de antocianinas. No entanto, com o aumento da temperatura de extração (40 e 70 °C) ocorreu uma diminuição do rendimento, que poderá ser devido à degradação das antocianinas. Essa degradação poderá estar relacionada com reações de hidrólise das antocianinas, quando expostas a temperaturas elevadas e à presença de um ácido na solução de extração.

1.3.2.3 Luz

As antocianinas são geralmente instáveis quando expostas a luz UV, visível ou a outras fontes de radiação ionizante, pois a luz provoca um aumento da degradação térmica



das antocianinas, através da formação de um estado de excitação do catião flavílico (Houghton & Hendry, 2012).

Em estudos com antocianinas obtidas a partir de *Alcalipha hispida* (Bailoni, Bobbio, & Bobbio, 1998), obteve-se uma perda de 50% da cor original após 2800 horas no escuro e após 721 horas sob exposição à luz, nas soluções de antocianinas em tampão citrato/fosfato (pH 3) numa temperatura de 21°C.

1.3.2.4 Copigmentação

A reação de copigmentação é uma das grandes responsáveis pela estabilidade das antocianinas na natureza, mantendo, por exemplo, a sua cor viva nos tecidos vegetais, que possuem pH típico entre 3,5 e 5,5.

Esta reação ocorre através de ligações de hidrogénio entre os grupos fenólicos das moléculas de antocianinas e flavonas, onde as moléculas de flavona se intercalam entre as de antocianina para formar empilhamentos alternados (Wong, 1995). Aminoácidos, ácidos orgânicos, outros flavonoides e alcaloides, são exemplos de compostos que podem atuar como copigmento de antocianinas (Lopes et al., 2007). A copigmentação causa um aumento do comprimento de onda da absorção máxima no intervalo visível (efeito batocrómico), resultante de uma redução na distribuição de carga local ou na polaridade da antocianina após a complexação com o copigmento, e assim um aumento na intensidade da cor (Houghton & Hendry, 2012).

1.3.3 Extração das antocianinas

A escolha de um método para extrair antocianinas de qualquer uma das suas várias fontes, depende do propósito da extração e também da natureza das antocianinas constituintes da matriz. Além disso, é necessário ter conhecimento dos fatores que influenciam a estrutura e a estabilidade dos compostos antociânicos. Se a finalidade da extração for analisar de forma qualitativa ou quantitativa os pigmentos, é preferível a utilização de um método que mantenha os compostos o mais próximo possível do seu estado natural. Já, para a utilização como corante/ingrediente alimentar, objetivam-se fatores como o rendimento que maximiza a extração do pigmento, a resistência e a estabilidade da matéria corante (Houghton & Hendry, 2012).



As antocianinas são mais solúveis em solventes polares do que as antocianidinas, devido à presença de grupos substituintes (grupos hidroxilo, carboxilo e metilo) e residuais glucósidos ligados aos seus anéis aromáticos. Consequentemente, são mais facilmente extraídas em água, metanol e/ou etanol do que em solventes não-polares. Além disso, a solubilidade das antocianinas aumenta quando estão num meio ácido, visto que causa perturbação nas membranas celulares da planta e, simultaneamente, dissolvem os pigmentos solúveis em água (Sampaio, 2009), por isso é que normalmente se utilizam solventes acidificados para extrair este tipo de moléculas. Esta acidificação promove ainda a estabilização das antocianinas, conforme referido na secção 1.3.2.1.

O meio tradicional e mais comum de extração de antocianinas envolve uma técnica de maceração (extração sólido-líquido), geralmente assistida por energia calorífica. Conforme Lopes et al., (2007), os métodos convencionais utilizam ácido clorídrico diluído em metanol, onde a solução contendo 0,001% v/v de HCl se mostra a mais efetiva. Apesar de solventes como metanol e acetona serem muito utilizados, quando o extrato é destinado para a indústria cosmética, farmacêutica ou alimentar, o uso deste tipo de solventes apresenta restrições devido a toxicidade, alto custo e impacto ambiental dos resíduos (Sampaio, 2009). Neste caso a extração é preferivelmente realizada com etanol ou água, acidificado(a).

A acidificação com HCl serve para manter um pH baixo, no entanto, o uso de ácidos minerais podem alterar a forma nativa dos pigmentos complexos, rompendo associações com metais, copigmentos, entre outros. Desta forma, os ácidos orgânicos mais fracos, como o ácido fórmico, acético, cítrico e tartárico, ou ácidos mais fortes e voláteis, como o ácido trifluoroacético, tornaram-se mais adequados para serem usados em solventes de extração para este tipo de compostos (Houghton & Hendry, 2012; Lopes et al., 2007).

Sampaio (2009) também aponta que a temperatura é um fator influente na eficiência da extração, como já mencionado anteriormente. Temperaturas elevadas facilitam a libertação das antocianinas dos vacúolos celulares, aumentando a permeabilidade do solvente nas estruturas celulares da matriz e reduzindo o tempo de extração. Contudo, temperaturas muito elevadas afetam a estabilidade das antocianinas, causando degradação das mesmas e reduzindo o rendimento da extração.

Além da técnica de maceração, outra técnica de extração de antocianinas muito utilizada é a extração assistida por energia de ultrassons. Este método é capaz de melhorar a transferência de massa, de forma a reduzir o tempo do processo de extração e o consumo



de solvente (Vilkhu, Mawson, Simons, & Bates, 2008). Isto porque, o ultrassom atua através da propagação das ondas ultrassônicas e das forças de cavitação resultante, fazendo com que bolhas choquem de forma intensa, gerando pressão e consequente ruptura dos tecidos, favorecendo assim a libertação das substâncias intracelulares no solvente (Schons et al., 2017).

Para a otimização do processo de extração utilizam-se modelos matemáticos, como a metodologia de superfície de resposta (RSM). Segundo Bezerra et al. (2008) a RSM é “uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas baseadas no ajuste de uma equação polinomial aos dados experimentais, que deve descrever o comportamento de um conjunto de dados com o objetivo de fazer previsões estatísticas”. Com isso, é possível obter os parâmetros de extração mais eficientes.

Esta metodologia foi utilizada por Roriz, Barros, Prieto, Morales, & Ferreira (2017) na otimização das variáveis de extração de betacianinas de partes florais de *Gomphrena globosa* L. por maceração. A RSM foi utilizada no projeto experimental para testar as variáveis de tempo, temperatura, proporção etanol-água, e relação sólido-líquido da extração. Num outro estudo (Roriz, Barros, Prieto, Barreiro, et al., 2017) a metodologia RSM assistiu a otimização do processo de extração desse corante por micro-ondas (MAE) e por ultrassons (EAU), também avaliando quatro variáveis de extração para cada método.

1.4 *Prunus spinosa* L. como fonte de antocianinas

Prunus spinosa L., vulgarmente conhecido como abrunheiro, ameixeira brava ou ameixoeira brava, é um arbusto caducifólio muito espinhoso que dá origem ao abrunho, um fruto do tipo drupa carnuda (**Figura 4**), que possui sabor ácido e adstringente e coloração azul-escuro na maturação. Pertence à família Rosaceae, podendo ser encontrado por toda a Europa, oeste da Sibéria, Cáucaso, sudoeste da Ásia e noroeste da África.



Figura 4: Frutos de *Prunus spinosa* L. Fonte: <<http://flora-on.pt/index.php#/0cED2>>. Acesso em: 07 jan. 2018.

De obtenção silvestre, esses frutos são subexplorados industrialmente, sendo comumente utilizados na preparação de licor (com o fruto, aguardente, açúcar e canela), tendo também aplicação medicinal no alívio da dor intestinal e contra constipação, para além do seu uso animal, como diurético para porcos (Carvalho, 2005). Guimarães et al. (2013) descrevem ainda o consumo dos frutos frescos e o seu uso como adstringentes e purgativos.

No geral, as plantas e frutos silvestres sempre foram um elemento importante na dieta mediterrânica, devido à presença de uma grande variedade de nutrientes e compostos bioativos, muitas vezes em maior quantidade do que em espécies cultivadas (Morales et al., 2013).

Segundo estudos recentes, *P. spinosa* tem demonstrado ser uma boa fonte de compostos fenólicos, incluindo antocianinas, com um grande potencial antioxidante e anticarcinogénico. Guimarães et al. (2013) analisaram a composição fenólica de quatro espécies de frutos silvestres do nordeste de Portugal. Nesse estudo, os frutos de *P. spinosa* apresentaram a maior concentração em ácidos fenólicos (29,78 mg/100 g de massa seca), sendo o ácido 3-*O*-cafeoilquínico o mais abundante, e flavonas/óis (57,48 mg/100 g), entre os quais a quercetina 3-rutinósido (15,63 mg/100 g) foi o composto maioritário. Também foi o fruto que apresentou as maiores concentrações de antocianinas, nas quais predominaram a cianidina 3-rutinósido e a peonidina 3-rutinósido. Apresentou, ainda, o perfil de antocianinas mais complexo entre os frutos analisados e os maiores níveis de ácidos fenólicos e flavonoides.



Nos estudos de bioatividade, Guimarães et al. (2014) avaliaram e compararam as propriedades antioxidantes e citotóxicas *in vitro* de extratos ricos em compostos fenólicos não-antociânicos (PE) e extratos ricos em compostos fenólicos antociânicos (AE) de frutos silvestres de *Arbutus unedo* L., *P. spinosa*, *Rosa micrantha* Borrer ex Sm e *Rosa canina* L.. A amostra de *P. spinosa* PE apresentou um alto potencial antioxidante e foi a segunda amostra que apresentou maior atividade citotóxica, em que os principais contribuintes demonstraram ser os ácidos fenólicos e flavonas/óis, presentes no PE. Já a amostra de *P. spinosa* AE, devido a um efeito pro-oxidante das antocianinas, apresentou menor atividade antioxidante com menor efeito citotóxico, mas ainda significativos.

Barros, Carvalho, Morais, & Ferreira (2010) realizaram uma caracterização dos nutrientes e fitoquímicos com propriedades antioxidantes de três frutos silvestres, entre eles estavam incluídos os frutos de *P. spinosa*. Os frutos analisados apresentaram fitoquímicos bioativos muito úteis, como fenólicos, vitaminas (ácido ascórbico e tocoferóis) e carotenoides, além de demonstrarem ter atividade antioxidante.

Através de estudos como estes é possível dizer que, devido às altas concentrações de antocianinas e as demais propriedades funcionais descritas, os frutos de *P. spinosa* poderão ser uma potencial fonte de corantes naturais para uso alimentar a ser explorada.



Desenvolvimento de um corante alimentar natural à base de antocianinas obtido a partir do epicarpo de frutos de *Prunus spinosa* L.: otimização da extração e estudo de aplicação

2 Objetivos



O presente estudo teve como objetivo principal o desenvolvimento de um corante natural alimentar, utilizando como fonte de antocianinas o epicarpo dos frutos de *Prunus spinosa* L.

Assim, o trabalho foi estruturado de acordo com os seguintes objetivos específicos:

- Otimização do processo de extração de antocianinas comparando duas técnicas assistidas por diferentes energias físicas: calor (HAE) e ultrassons (UAE), aplicando um modelo matemático de análise de superfície de resposta, utilizando um desenho composto central circunscrito de três variáveis e cinco níveis.
- Caracterização e quantificação das antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de fotodíodos e a um espectrômetro de massa com uma fonte de ionização de *electrospray* (HPLC-DAD-ESI/MS);
- Avaliação do potencial bioativo do extrato corante obtido nas condições ótimas, através de análises de atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e citotóxica em células tumorais e não-tumorais.
- Incorporação do corante obtido pelo processo de extração otimizado num produto alimentar de confeitaria (“beijinhos”), de forma a comprovar a sua capacidade corante, e análise dos parâmetros de cor, pH e textura, composição nutricional e valor energético logo após a sua preparação e durante o armazenamento.



3 **Materiais e Métodos**



3.1 Material vegetal

Os frutos maduros de *P. spinosa* foram colhidos em Bragança (Trás-os-Montes, Nordeste de Portugal) em setembro de 2017, o epicarpo foi separado do resto do fruto, congelado e liofilizado. Posteriormente, a amostra foi reduzida a um pó fino (~ 20 mesh), e armazenada sob refrigeração, protegida da luz para posterior análise.

3.2 Padrões e reagentes

O solvente acetonitrilo de grau de pureza HPLC foi adquirido na Fisher Scientific e os padrões (cianidina 3-glucósido e peonidina 3-glucósido) na Polyphenols. O padrão trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) na empresa Panreac e o dicloro-hidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH) foi adquirido na Sigma-Aldrich. O éter dietílico era da marca Lab-Scan, e tolueno e ácido sulfúrico, da marca Sigma Chemical Co. O soro fetal de bovino (FBS), a solução salina balanceada de Hank (HBSS), a tripsina, a solução de penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100 µg/mL), o RPMI-1640 (meio Instituto Memorial Parque Roswell) e o meio DMEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco) foram adquiridos na empresa Hyclone. O ácido acético, ácido fórmico, elipticina, sulforodamina B (SRB), Azul de Trypan, ácido tricloroacético (TCA) e Tris foram fornecidos pela Sigma-Aldrich. As células RAW 264.7 foram compradas à ECACC (Colecção Europeia de Cultura Celular Animal). O Kit de Reagentes Griess foi adquirido da Promega. O cloreto de *p*-iodonitrotetrazóico (INT) foi adquirido na Panreac Applichem, o caldo triptona de soja (TSB) e o Caldo Mueller Hinton (MHB) na Biolab®. Os restantes reagentes químicos utilizados foram adquiridos na Sigma Chemical Co. Todos os outros produtos químicos eram de grau analítico e obtidos através de fornecedores comuns. A água ultrapura utilizada foi tratada num sistema de purificação Milli-Q (Millipore, model A10, Billerica, MA, USA).



3.3 Otimização do processo de obtenção de corante à base de antocianinas do epicarpo de frutos de *Prunus spinosa* L. comparando duas técnicas de extração

3.3.1 Procedimentos de extração para o epicarpo de frutos de *P. Spinosa*

3.3.1.1 *Extração assistida por calor (HAE)*

A HAE consiste em colocar a amostra em pó em contacto com um solvente polar acidificado a determinada temperatura, sob agitação (Wang, Jung, Tomasino, & Zhao, 2016). É um método convencional tipicamente utilizado à escala industrial, dada a sua simplicidade (Roriz, Barros, Prieto, Morales, et al., 2017). A HAE foi realizada utilizando banho-maria com agitação através de um agitador magnético Cimarec™ sob uma velocidade fixa (500 rpm, Thermo Scientific). Para minimizar a evaporação do solvente, a extração foi realizada num frasco fechado. A amostra de epicarpo de frutos de *P. spinosa* (1,0 g) foi sujeita a extração com 20 mL de solvente (etanol/água) acidificado (pH 3, ácido cítrico) em diferentes condições, definidas previamente pelo modelo de RSM estabelecido (**Tabela 4**, ver seção 4.1.2): tempo (t ou X_1 , 5 a 85 min), temperatura (T ou X_2 , 20 a 90°C) e teor de etanol (S ou X_3 , 0 a 100%). A relação sólido-líquido (S/L ou X_4) foi mantida a 50 g/L.

3.3.1.2 *Extração assistida por ultrassons (UAE)*

A UAE baseia-se na cavitação para destruição celular e liberação de antocianinas no solvente, reduzindo variáveis como tempo, temperatura e quantidade de solvente (Acam, Akyildiz, & Balasubramaniam, 2017). A UAE foi realizada utilizando um dispositivo ultrassónico (sonicadores QSonica, modelo CL-334) em frequência fixa (40 kHz), utilizando como variáveis: potência ultrassónica (P) e t , que foram programados de acordo com o modelo experimental de RSM definido (**Tabela 4**). Os frascos com condensadores foram sempre posicionados à mesma distância do transdutor sem agitação adicional. A P e o t foram controlados a partir do painel do instrumento. Para controlar a T , isto é, para evitar aquecimento excessivo, foi utilizado um banho de gelo. O epicarpo em pó (2,5 g) foi colocado num gobelé com 50 mL de solvente (etanol/água) acidificado (pH 3, ácido cítrico) e extraído sob diferentes condições: t (ou X_1 , 5 a 25 min), P (ou X_2 , 100 a 400 W) e S (ou X_3 , 0 a 100%). A S/L (ou X_4) foi mantida a 50 g/L.



3.3.1.3 Processamento da amostra pós-extração

No final de cada extração (HAE e UAE), as amostras foram centrifugadas (6000 rpm durante 20 min a 10 °C) e filtradas através de filtro de papel Whatman nº 4 para remoção dos sólidos em suspensão. O sobrenadante foi colhido e dividido em duas porções para análise de antocianinas por HPLC e para determinação do rendimento da extração. A porção separada para análise em HPLC (3 mL) foi seca a 35°C e redissolvida em água acidificada (solução de ácido cítrico com pH 3) e filtrada através de filtro de seringa LC (0,22 µm), enquanto a porção para determinação do rendimento de extração (5 mL) foi seca a 105°C durante 48 horas para posterior pesagem.

3.3.2 Identificação e quantificação de antocianinas por HPLC

Os extratos foram analisados utilizando um sistema Dionex Ultimate 3000 HPLC (Thermo Scientific) equipado com uma bomba quaternária, um injetor automático (a 5 °C), um desgaseificador e um compartimento de coluna com termostato automatizado. A detecção dos compostos foi efetuada com detetor de díodos (DAD), usando os comprimentos de onda de 520 nm e acoplado a um detetor de espectrometria de massa (HPLC-DAD-ESI/MS).

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (3 µm, 4,6 mm × 150 mm, Waters), a 35 °C. A fase móvel foi 0,1% TFA em água (A) e 100% acetonitrilo (B). O gradiente de eluição foi de 10% B até 3 min, 10 a 15% B mais 12 min, isocrático 15% B mais 5 min, 15 a 18% B mais 5 min, 18 a 30% B mais 20 min e 30 a 35% mais 5 min, a uma taxa de 0,5 mL/min.

A detecção de MS foi feita utilizando um espectrómetro de massa Ion Trap Linear LTQ XL (ThermoFinnigan), equipado com uma fonte de ionização *electrospray* (ESI). O gás de arraste utilizado foi o azoto (50 psi); o sistema trabalhou com uma voltagem de *spray* de 4,8 kV, a uma temperatura inicial de 320 °C e tensão capilar de 14 V. A voltagem do *tube lens offset* foi mantida a 75 V. Os espectros foram gravados em modo de ião positivo entre 100 e 1500 m/z. A energia de colisão utilizada foi de 20 (unidades arbitrárias). Os dados foram recolhidos e analisados utilizando o programa Xcalibur® (ThermoFinnigan).

As antocianinas presentes nas amostras foram caracterizadas de acordo com os seus espectros UV e massa, e tempos de retenção em comparação com padrões autênticos, quando disponíveis. As antocianinas cianidina 3-rutinósido (C1) e peonidina 3-rutinósido



(C2) foram os compostos mais relevantes encontrados, e foram, portanto, quantificadas. Para análise quantitativa, uma curva de calibração de cinco níveis foi obtida através da injeção de padrões de concentrações conhecidas (200-0,3125 $\mu\text{g/mL}$) de cianidina 3-glucósido ($y = 146924 x - 671583$; $R^2 = 0.9953$) e de peonidina 3-glicósido ($y = 166905 x - 442698$; $R^2 = 0.9965$).

3.3.3 Formatos dos valores de resposta para apresentação de resultados

A concentração dos dois compostos antociânicos (C, C1 ou C2) e a sua soma (C total, CT) foram utilizados como respostas em cada técnica aplicada. Os resultados foram expressos de acordo com dois formatos de resposta (Y): Y_1 , em mg de C por grama de resíduo extraído (mg C/g R), que foi especificamente usado para avaliar a pureza do C nos extratos; e Y_2 , em mg de C por g de peso seco de epicarpo do fruto (mg C/g E dw), que foi utilizado especificamente para analisar o rendimento de extração do C. Ambas as respostas foram igualmente analisadas, mas foram feitas considerações adicionais sobre a última (Y_2 , mg C/g E dw) na apresentação dos resultados, uma vez que é considerada como uma resposta importante quando se trata de otimização e transferência industrial. Dividindo estas respostas, Y_2/Y_1 , obtém-se a quantidade de resíduo extraído (g R/g E dw), que fornece informações sobre o terceiro critério de resposta expresso (*Rendimento*, %).

3.3.4 Desenho experimental, análise de modelos e avaliação estatística

3.3.4.1 *Desenho experimental RSM*

Foram realizados ensaios baseados num fator de cada vez, ou seja, na análise de cada uma das variáveis para cada uma das técnicas selecionadas. As variáveis que originaram mudanças significativas, juntamente com as faixas relevantes, foram selecionadas para cada uma das técnicas estudadas (**Tabela 4**). Os efeitos combinados das três variáveis definidas foram estudados utilizando um *desenho composto central circunscrito* (CCCD), usando cinco níveis para cada um (Helena et al., 2016), com vinte e oito combinações de respostas.

3.3.4.2 *Modelo matemático*

Os dados de RSM foram ajustados através do cálculo dos mínimos quadrados usando a seguinte equação polinomial de segunda ordem (Eq. 1):



$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{\substack{j=2 \\ j>i}}^n b_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n b_{ii} X_i^2 \quad (1)$$

onde Y é a variável dependente (variável de resposta) a ser modelada, X_i e X_j definem as variáveis independentes, b_0 é o coeficiente constante, b_i é o coeficiente de efeito linear, b_{ij} é o coeficiente de efeito de interação, b_{ii} o coeficiente de efeito quadrático e n é o número de variáveis. Como respostas, foram utilizados os três formatos de valores: Y_1 (mg C/g R), Y_2 (mg C/g E dw) e *Rendimento* (%).

3.3.4.3 Procedimento para otimizar as variáveis para uma resposta máxima

Um método simplex foi utilizado para otimizar o modelo de previsão, resolvendo problemas não lineares, a fim de maximizar o rendimento da extração e a recuperação de antocianinas (Vieira et al., 2017). Certas limitações foram impostas (por exemplo, os tempos não poderiam ser inferiores a 0) para evitar variáveis com condições físicas não naturais e irrealistas.

3.3.4.4 Análise dose-resposta da relação sólido-líquido

Uma vez encontradas as condições ótimas (X_1 , X_2 e X_3), a seguinte etapa de otimização foi usada para descrever o padrão da relação sólido-líquido, S/L (ou X_4 , expresso em g/L). O objetivo foi alcançar condições mais produtivas, conforme exigido pelas aplicações industriais. Em todos os casos, os pontos experimentais seguiram padrões de distribuição lineares à medida que o S/L aumenta, conseqüentemente, usaram-se modelos lineares com ordenada na origem para avaliar as respostas. O valor paramétrico do declive (m) foi usado para avaliar a dose-resposta. Valores positivos indicam um aumento nas respostas de extração, enquanto valores negativos designam uma diminuição na eficiência de extração, conforme a S/L aumenta.

3.3.5 Métodos numéricos, análise estatística e ilustrações gráficas

Procedimentos de ajustes, estimativas de coeficientes e cálculos estatísticos foram obtidos como descrito anteriormente por outros autores (Prieto & Vázquez, 2014). Em resumo, a) a determinação dos parâmetros foi realizada utilizando-se o algoritmo quase-Newton (mínimos quadrados), executando a função ‘*Solver*’ integrada no Microsoft Excel minimizando as diferenças entre os valores observados e previstos; b) as ilustrações



gráficas foram obtidas pelo *software* 'DeltaGraph'; c) a significância dos coeficientes foi avaliada usando a função 'SolverAid' para determinar seus intervalos ($\alpha = 0,05$); e d) a consistência do modelo foi comprovada através de vários critérios estatísticos: i) o Teste de Fisher ($\alpha = 0,05$) foi utilizado para avaliar a adequação dos modelos para descrever os dados observados; ii) a função 'SolverStat' foi usada para a avaliação das incertezas de previsão de parâmetros e modelos (Murado García & Prieto Lage, 2013); e iii) o R^2 foi interpretado como a proporção de variabilidade da variável dependente explicada pelo modelo.

3.4 Preparação de extrato corante à base de antocianinas do epicarpo de frutos de *Prunus spinosa* L., seguindo as condições ótimas, para estudos de bioatividade e de incorporação

Para a obtenção do extrato corante à base de cianidina 3-rutinósido e peonidina 3-rutinósido, realizou-se a extração do epicarpo de frutos de *Prunus spinosa* L. seguindo o processo previamente otimizado. Brevemente, a amostra e o solvente etanol:água (50:50 v/v) acidificado (pH 3, ácido cítrico) foram adicionados num frasco na proporção de 75 g/L e a extração foi realizada num aparelho de sonda ultrassônica (sonicadores QSonica, model CL-334) por 5 min a 400 W. As amostras foram centrifugadas (6000 rpm durante 20 min a 10 °C) e filtradas através de papel filtro Whatman n° 4 para remoção de sólidos suspensos. O sobrenadante colhido foi evaporado num evaporador rotativo a 35 °C para remover o etanol, liofilizado (FreeZone 4.5, Labconco) e armazenado sob refrigeração para análises posteriores. A cor do extrato obtido foi medido através de um colorímetro (modelo CR-400, Konica Minolta Sensing Inc.) (Fernandes et al., 2018).



3.5 Avaliação das propriedades bioativas do corante à base de antocianinas do epicarpo de frutos de *Prunus spinosa* L. obtido pelo processo de extração otimizado

3.5.1 Atividade antioxidante

3.5.1.1 Inibição da peroxidação lipídica através de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para este ensaio preparou-se inicialmente uma suspensão utilizando uma porção de cérebro de porco juntamente com tampão tris-HCl (20 mM, pH=7,4), que foi homogeneizada e centrifugada (10 min, 3500 g), recolhendo-se o sobrenadante.

Foram realizadas 10 diluições sucessivas do extrato corante a partir de uma solução inicial de concentração 5 mg/mL. Estas soluções (200 µL) foram adicionadas, em tubos de *eppendorf*, a ácido ascórbico, sulfato de ferro e sobrenadante da suspensão de cérebro (100 µL de cada), e os tubos foram incubados a 37 °C por 1 h.

De seguida, adicionou-se ácido tricloroacético (28%, 500 µL) e ácido tiobarbitúrico (2%, 380 µL) aos tubos, que foram novamente incubados a 80 °C por 20 min. Por fim, os tubos foram centrifugados e mediu-se a absorbância do sobrenadante a 532 nm.

A percentagem de inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada utilizando a seguinte fórmula: $[(A - B) / A] \times 100$, onde A e B representam a absorvância do controlo e da solução com o extrato, respetivamente. A concentração de extrato que fornece 50% de inibição da peroxidação lipídica (EC₅₀) foi calculada a partir do gráfico da percentagem de inibição da formação de TBARS em função da concentração de extrato. Como controlo positivo foi utilizado o trolox (Barros et al., 2010).

3.5.1.2 Inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA)

Para este ensaio foram utilizadas amostras de sangue de ovelha colhidas de animais saudáveis, as quais foram centrifugadas a 1000 g (5 min, 10 °C) para obtenção dos eritrócitos, descartando-se as camadas sobrenadantes. Os eritrócitos recuperados foram lavados uma vez com NaCl (150 mM) e três vezes com PBS (pH 7,4) (Evans et al., 2013). O sedimento de eritrócito foi ressuspensão em PBS a 2,8% (v/v).

Numa microplaca de 48 poços de fundo plano, esta solução de eritrócitos (200 µL) foi misturada com 400 µL das amostras antioxidantes dissolvidas em PBS, ou com



solução de PBsoxS como controlo, ou com água para obtenção da hemólise completa. A placa foi então pré-incubada (37 °C, 10 min) com agitação, adicionando-se posteriormente AAPH (200 µL, 160 mM em PBS) e incubando-se novamente nas mesmas condições. A densidade óptica foi medida a 690 nm a cada 10 minutos (Takebayashi, Iwahashi, Ishimi, & Tai, 2012). O cálculo da percentagem da população de eritrócitos que permaneceu intacta (P) realizou-se da seguinte forma:

$$P (\%) = (S_t - CH_0 / S_0 - CH_0) \times 100$$

onde S_t e S_0 correspondem à densidade óptica da amostra nos tempos t e 0 min, respetivamente, e CH_0 é a densidade óptica da hemólise completa a 0 min. Os resultados foram expressos como tempo de atraso da hemólise (Δt), sendo obtidos pelo cálculo seguinte:

$$\Delta t (\text{min}) = Ht_{50} (\text{amostra}) - Ht_{50} (\text{controlo})$$

onde Ht_{50} é o tempo hemolítico de 50% (min) obtido graficamente a partir da curva de hemólise de cada concentração de amostra de antioxidante.

Posteriormente, foram estabelecidas correlações lineares entre os valores de Δt e as diferentes concentrações de amostra (Takebayashi et al., 2012). A partir das mesmas, foi calculada a concentração capaz de retardar a hemólise em 60 min ($EC_{50(60 \text{ min})}$, µg/mL) e 120 min ($EC_{50(120 \text{ min})}$, µg/mL).

3.5.2 Potencial citotóxico em células tumorais e não tumorais

Para a avaliação da atividade citotóxica do extrato corante foi realizado o ensaio da Sulforodamina B (SRB) em linhas celulares tumorais humanas e numa cultura primária de células hepáticas não tumorais. O extrato foi testado em concentrações de 8 a 0,125 mg/mL, diluído em água.

Na determinação da inibição do crescimento de células tumorais foram testadas 4 linhas celulares tumorais humanas: NCI-H460 (carcinoma de pulmão), MCF-7 (carcinoma da mama), HepG2 (carcinoma hepatocelular) e HeLa (carcinoma cervical) obtidas no DSMZ – Leibniz – Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Para isso, utilizou-se o meio de cultura RPMI-1640 contendo FBS (10%), inativado pelo calor, suplementado com glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As células foram mantidas numa incubadora a 37 °C com ar humidificado e 5% de CO_2 .



Para garantir o desprendimento e desaglomeração das células, previamente aos ensaios foi adicionada tripsina (enzima proteolítica) às culturas de células aderentes. Após verificado o desprendimento (5 min), as células foram centrifugadas (5 min, 1200 rpm), coletadas e ressuspendidas em meio RPMI.

As linhas celulares foram preparadas à densidade celular apropriada ($1,0 \times 10^4$ células/poço), utilizando placas de 96 poços, e incubada por 24 h para ocorrer a fixação das células. Adicionaram-se as concentrações de extrato a serem testadas a incubou-se por mais 48 h. Como controlo positivo foi utilizada a elipticina.

Posteriormente, foi adicionado ácido tricloroacético frio (10%, 100 μ L) para fixar as células, deixando-se repousar durante 1 h a 4 °C. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com água ultrapura e secas ao ar. Adicionou-se solução SRB (0,1% em 1% de ácido acético, 100 μ L) e incubou-se à temperatura ambiente por 30 min. As placas foram, então, lavadas com ácido acético (1%) para retirar o excesso de SRB e deixadas secar ao ar. Por fim, a SRB foi solubilizada pela adição de tris- (10 mM, 200 μ L) e seguiu-se a leitura da absorbância a 540 nm, num leitor de microplacas (Biotek ELX800).

Relativamente à avaliação do efeito citotóxico em células não tumorais, foi utilizada uma cultura de células preparada a partir de fígado de porco obtido num matadouro local (PLP2). Para isso, o tecido do fígado foi lavado com HBSS, uma solução salina que contém penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 μ g/mL), e dividido em explantes que foram colocados em frascos com DMEM suplementado com FBS (10%), aminoácidos não essenciais (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). Os frascos foram incubados a 37 °C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂. Com a utilização de um microscópio de contraste de fase fez-se um acompanhamento do crescimento celular, renovando-se o meio a cada dois dias.

Estas células foram subcultivadas e preparadas à densidade apropriada ($1,0 \times 10^4$ células/poço), utilizando placas de 96 poços. Foi efetuada a análise para cada uma das diluições do extrato seguindo o ensaio SRB, conforme anteriormente descrito.

Para cada linha celular testada foram obtidas curvas de dose-resposta e foram calculados os valores de GI₅₀, correspondentes à concentração de extrato que inibe 50% da proliferação celular (Abreu et al., 2011; Corrêa et al., 2017).



3.5.3 Atividade anti-inflamatória

Para a avaliação da atividade anti-inflamatória foram utilizadas células macrófagas de rato RAW 264.7, seguindo o procedimento descrito por Corrêa et al. (2015). As culturas de células foram preparadas em meio DMEM suplementado com FBS (10%), glutamina (1%), aminoácidos não essenciais (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL), e mantidas a 37 °C com ar humidificado e 5% de CO₂.

As células com crescimento ativo foram raspadas e ajustadas a uma densidade celular de 5×10^5 células/mL, com uma proporção de células mortas inferior a 5%, conforme teste de exclusão de Azul de Trypan.

As células foram distribuídas (300 µL/poço) em microplacas de 96 poços e deixadas a aderir e multiplicar por 24 h, incubando a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, foram tratadas com as diferentes soluções do extrato corante (15 µL), em concentrações de 400 a 1,56 µg/mL, reincubando-se por 1 h. Seguidamente, receberam estimulações com lipopolissacáridos (LPS, 1 µg/mL, 30 µL) durante 24 h. Os controlos negativos foram preparados sem adição de LPS para observação de possível indução destes nas alterações dos níveis basais de óxido nítrico (NO). Para o controlo positivo foi utilizada dexametasona (50 µM).

A presença do óxido nítrico foi determinada pela utilização de um Kit de Reagentes Griess contendo sulfanilamida, hidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) e soluções nitradas. Para isso, o sobrenadante da solução de células (100 µL) foi transferido para uma microplaca juntamente com sulfanilamida e solução NED, e foram misturados por 5 a 10 min cada, à temperatura ambiente. Numa microplaca de 96 poços, foi preparada uma curva de referência para o NaNO₂ (100 µM a 1,6 µM; $y = 0,0066x + 0,1349$; $R^2 = 0,9986$). Determinou-se a quantidade de óxido nítrico produzido através da medição da absorbância a 540 nm, num leitor de microplacas ELX800 Biotek, comparando-se com a curva de calibração. Por fim, determinou-se a concentração de extrato que provocou 50% de inibição da produção de NO (EC₅₀, µg/mL).

3.5.4 Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada utilizando microrganismos provenientes de isolados clínicos (Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro). Foram usadas nove bactérias:



Bactérias Gram-positivo: *Enterococcus faecalis* isolada de urina, *Listeria monocytogenes* isolada a partir do fluído da medula cérebro-espinal, *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA) isolada do exsudado de ferida, e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) isolada de expetoração.

Bactérias Gram-negativo: *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis* isoladas de expetoração, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Morganella morganii* isoladas de urina.

A identificação dos microrganismos e os testes de suscetibilidade foram feitos utilizando painéis MicroScan (MicroScan®; Siemens Medical Solutions Diagnostic) pelo método de microdiluição em placa. Os critérios de interpretação foram baseados em Breakpoints Interpretativos, conforme indicado no Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008) e no European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2013).

Para determinar a atividade antimicrobiana do extrato foi utilizado o método de microdiluição em microplaca por ensaio colorimétrico utilizando o corante cloreto de p-iodonitrotetrazólico (INT) segundo o protocolo de Kuetze et al. (2011) com algumas modificações. Foi preparada uma solução padrão a partir do extrato corante dissolvendo 100 mg em 750 µL de meio de cultura Caldo Mueller Hinton (MHB) ou caldo tripton de soja (TSB) de acordo com o tipo de bactéria e 250 µL de DMSO.

Em seguida, utilizando microplacas de 96 poços, adicionou-se o extrato corante diluído em meio de cultura de forma a obter uma concentração inicial de 20 mg/mL no primeiro poço, realizando-se diluições sucessivas nos restantes poços até à concentração de 0,156 mg/mL. Depois de previamente preparado o inóculo bacteriano de 0,5 na escala de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), este foi adicionado a todos os poços (10 µL de inóculo). As microplacas foram incubadas durante 24 h a 37 °C. Os ensaios foram realizados em duplicado. Foram utilizados 3 controlos negativos: um com meio de cultura (MHB ou TSB) com DMSO (5%), outro com meio de cultura (MHB ou TSB), inóculo bacteriano e antibiótico, e outro apenas com o extrato corante. Os antibióticos utilizados foram a vancomicina para as bactérias Gram-positivo e a ampicilina e imipenem para as Gram-negativo. Foi ainda realizado um controlo positivo com bactéria e meio de cultura (MHB/TSB) com 5% de DMSO.

Após 24 horas de incubação foi adicionado 40 µL de INT (0,2 mg/mL) às microplacas e reincubou-se a 37 °C durante 30 min. Os organismos viáveis provocaram uma alteração na cor de amarelo a cor-de-rosa. A Concentração mínima inibitória (MIC)



foi definida como sendo a menor concentração de extrato para inibir o crescimento bacteriano.

3.6 Estudo da incorporação do extrato corante à base de antocianinas do epicarpo de frutos de *Prunus spinosa* L. num produto de confeitaria

3.6.1 Preparação dos “beijinhos”

Para a preparação da massa base dos “beijinhos” foram utilizados 800 g de leite condensado, 200 g de natas e 24 g de manteiga. Estes ingredientes foram aquecidos utilizando uma temperatura moderada, mexendo constantemente até a massa atingir uma consistência suficiente para se desprender do fundo da panela. De seguida, interrompeu-se o aquecimento, adicionaram-se 4,8 g de ácido cítrico e separou-se a massa em duas partes iguais. Uma das partes da massa foi utilizada como controlo (sem adição de qualquer corante) e à outra parte foram adicionados 2,4 g de extrato corante de epicarpo de frutos de *P. spinosa*. Após arrefecimento, as partes de massa foram subdivididas em porções de 10 g, enroladas em bolas de modo a obter o formato típico de apresentação deste doce, organizadas conforme o tempo de armazenamento, T0 (dia da preparação) e T1 (dia posterior à preparação), e mantidas em refrigeração (4 ° C) para posterior análise.

3.6.2 Avaliação dos parâmetros de cor, pH e textura das amostras de “beijinhos”.

Os parâmetros de pH, cor e textura foram analisados nos tempos de armazenamento T0 e T1. O pH foi medido em triplicado diretamente em três diferentes porções de cada amostra utilizando um medidor de pH HI 99,161 (Hanna Instruments).

A cor foi medida em três pontos diferentes de três porções de cada amostra utilizando um colorímetro (modelo CR-400, Konica Minolta Sensing Inc.). Foram utilizados o iluminante C e uma abertura do diafragma de 8 mm, onde os valores de espaço de cor CIE L^* (luminosidade), a^* (verde/vermelho) e b^* (azul/amarelo) foram registados usando um *software* de dados “Spectra Magic Nx” (versão CM-S100W 2.03.0006) (Fernandes et al., 2018).



A textura foi determinada em triplicado para cada amostra utilizando um equipamento TA. XT. Plus Texture Analyser (Stable Micro System) com um disco de acrílico (40 mm) de forma a medir os seguintes parâmetros: dureza, adesividade, resiliência, coesão, elasticidade, gomosidade e mastigabilidade. As amostras tinham 25 mm de diâmetro e as velocidades de subida e de descida da sonda foram 1 mm/s e 5 mm/s, respectivamente.

3.6.3 Avaliação da composição nutricional e do valor energético das amostras de “beijinhos”.

As amostras foram previamente liofilizadas (FreeZone 4.5, Labconco), trituradas para obtenção de um pó homogêneo e armazenadas sob refrigeração (4 °C) para posterior análise. Para determinar a composição em macronutrientes e o valor energético das amostras de “beijinhos”, foram analisados os teores de humidade, cinzas, gordura, proteínas e hidratos de carbono, conforme os procedimentos da AOAC (2016). O teor de humidade foi determinado pela diferença de massa obtida no processo de secagem a 105 °C das amostras. As cinzas foram obtidas pela diferença de massa na incineração de 0,25 g de amostra a 550 °C ± 5 °C por 15 horas. O teor de gordura total foi determinado pela extração de 5 g de amostra conforme o método de Rose-Gottlieb. As proteínas totais (Nx6,38) foram obtidas pela técnica macro-Kjeldahl utilizando 0,5 g de amostras. Os hidratos de carbono (g/100 g fw) foram obtidos pelo cálculo de diferença: 100 – (massa de gordura (g/100 g fw) + massa de proteínas (g/100 g fw) + massa de cinzas (g/100 g fw)). A energia (kcal/100g fw) foi calculada através da equação: 9 × massa de gordura (g/100 g fw) + 4 × (massa de proteínas (g/100 g fw) + massa de hidratos de carbono (g/100 g fw)).

3.6.3.1 Açúcares livres

A determinação dos açúcares livres foi realizada conforme descrito por Barros et al. (2013). As amostras previamente deslipidificadas (1 g) foram enriquecidas com 1 mL de padrão interno melezitose (PI, 25 mg/mL) e sujeitas a um processo de extração com etanol (40 mL, 80%) a 80 °C, durante 90 min. A suspensão obtida foi centrifugada (10 min, 15000 g) e o sobrenadante foi colhido e concentrado a pressão reduzida, a 40 °C. Foram efetuadas lavagens sucessivas com éter dietílico para remoção de vestígios de gordura. Após nova concentração a 40 °C, os resíduos sólidos foram dissolvidos em água



para um volume final de 5 mL e filtrados para *vials*. A composição em açúcares livres foi, então, determinada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), estando o sistema HPLC (Knauer, sistema Smartline) equipado com um detetor de RI (Knauer, Smartline 2300) e uma coluna 100-5 NH₂ Eurospher (4,6 × 250 mm, 5 mm, Knauer), operando a 35 °C. Utilizou-se acetonitrilo/água ultrapura, 70:30 (v/v) num caudal de 1 mL/min, como fase móvel. Obteve-se a identificação dos açúcares por comparação dos tempos de retenção relativos dos picos das amostras com padrões. A quantificação foi efetuada pelo método do padrão interno utilizando o *software* Software Clarity 2.4 (DataApex) e os resultados foram expressos em g por 100 g de massa fresca.

3.6.3.2 Ácidos gordos

Os ácidos gordos foram determinados conforme descrito anteriormente por Barros et al. (2013), utilizando cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID), com processo prévio de trans-esterificação. Adicionaram-se 5 ml de metanol/ácido sulfúrico/tolueno 2:1:1 (v/v/v) às massas de gordura obtidas pela extração no método de Rose-Gottlieb das amostras de “beijinhos” e colocou-se em banho com agitação a 50 °C por 15 horas. Com recurso a agitação em *vortex* entre cada etapa, adicionaram-se 3 ml de água para separação de fases e 3 mL de éter dietílico para recuperação da FAME (ésteres metílicos de ácidos gordos). O sobrenadante foi recuperado, passado por sulfato de sódio anidro para remoção de resíduos de água e filtrado com filtro de nylon 0,2 µm Milipore para *vials*. O perfil de ácidos gordos foi determinado utilizando um GC modelo DANI 1000 equipado com um injetor *split/splitless*, um detetor de ionização de chama (FID) e uma coluna Macherey Nagel (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm). A temperatura do forno foi programada da seguinte forma: temperatura inicial da coluna a 50 °C por 2 min; aumento da temperatura em 30 °C/min até 125 °C, 5 °C/min até 160 °C, 20 °C/min até 180 °C, 3 °C/min até 200 °C e 20 °C/min até 220 °C, temperatura a que se manteve durante 15 min. Utilizou-se hidrogénio como gás de transporte com um caudal de 4,0 mL/min (0,61 bar), medido a 50 °C. A injeção *split* (1:40) foi realizada a 250 °C. Foram utilizadas injeções de 1 µL de amostra para cada análise. A identificação de ácidos gordos foi realizada com base nos tempos de retenção relativos dos picos da amostra por comparação com padrões. Os resultados foram processados usando o Software CSW 1,7 (DataApex 1,7) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.



3.6.4 Análise estatística dos parâmetros físico-químicos e reológicos dos “beijinhos”

Foram analisadas três amostras independentes de “beijinhos” e cada amostra foi caracterizada em triplicado. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os testes estatísticos foram aplicados considerando um valor de $\alpha=0,05$ (95% de confiança), utilizando o *software* IBM SPSS Statistics for Windows, versão 22.0. (IBM Corp.).

Foi feita uma análise de variância (ANOVA), com base no teste de Tukey (quando se verificou homoscedasticidade das distribuições) ou no teste de Tamhane’s T2 (distribuições heteroscedásticas) para conseguir classificar as diferenças estatísticas entre os diferentes parâmetros avaliados em cada um dos “beijinhos”. O cumprimento dos requisitos da ANOVA, especificamente a normalidade da distribuição dos resultados e a homogeneidade das variâncias, foi verificado através do teste de Shapiro Wilk e do teste de Levene, respectivamente.



4 Resultados e Discussão



4.1 Otimização do processo de obtenção de corante à base de antocianinas do epicarpo de frutos de *Prunus spinosa* L. comparando duas técnicas de extração

4.1.1 Aspectos gerais

As antocianinas são pigmentos naturais pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos e dentro da classe dos flavonoides, e que apresentam uma gama de cores entre vermelho, azul e violeta características de várias frutas e vegetais (Hernández-Herrero & Frutos, 2011). Além dos seus vários benefícios fisiológicos, tem havido um crescente interesse por estes compostos devido às suas propriedades corantes (Bouras et al., 2015; Olivas-Aguirre et al., 2016). Tal como acontece com outras espécies de *Prunus*, os compostos antociânicos podem ser encontrados nos frutos de *P. spinosa* em níveis elevados, sendo estes responsáveis pela sua coloração típica (Ieri, Pinelli, & Romani, 2012; Usenik, Fabčić, & Štampar, 2008). Para além disso, os frutos de *P. spinosa* constituem uma fonte subexplorada, dos quais não foram encontrados documentos sobre o uso industrial ou em grande escala. Assim, no presente trabalho, foram utilizados frutos de *P. spinosa*, com a finalidade de explorar a sua composição em antocianinas e promover um maior valor comercial destes frutos silvestres, mais especificamente do epicarpo, por apresentar uma cor muito mais intensa que a polpa e, portanto, maior concentração de antocianinas e menos compostos interferentes no processo de extração (por exemplo, açúcares).

O estudo foi conduzido selecionando duas técnicas relevantes de sólido-líquido para a extração de antocianinas, sendo utilizado um método convencional (HAE) e outro alternativo (UAE). A extração assistida por calor (HAE, ou maceração) é o método de extração sólido-líquido convencional para obter antocianinas a partir de matrizes de plantas, sendo uma técnica simples, com baixos requisitos em termos de equipamentos, mas que muitas vezes envolve longos tempos de extração e exige altas temperaturas. De entre os procedimentos não convencionais aplicados à extração de antocianinas, as técnicas de extração assistidas por ultrassons, microondas e fluidos supercríticos têm atraído, nos últimos anos, a atenção de industriais e investigadores (Roriz, Barros, Prieto, Morales, et al., 2017; Zhu et al., 2016). Em relação à extração assistida por ultrassons (UAE), esta é considerada uma alternativa de baixo custo, simples e eficiente comparativamente às técnicas convencionais (Agcam et al., 2017).



Os parâmetros considerados na otimização da extração (tempo, temperatura (HAE) ou potência (UAE), concentração de solvente, e relação sólido-líquido) e os valores centrais aplicados ao modelo RSM foram determinados com base na experiência do grupo de investigação, onde estes parâmetros demonstraram anteriormente serem os mais influentes (López et al., 2018), e em complemento com ensaios prévios para confirmação (ver seção 3.3.4). Os solventes de extração clássicos utilizados para extração de compostos antociânicos são água, solventes polares (por exemplo, metanol e etanol) e misturas de solventes orgânicos aquosos (Piñeiro, Palma, & Barroso, 2004; Vuong, Golding, Nguyen, & Roach, 2010). Como solvente de extração foi selecionada a mistura binária de etanol e água (concentração de etanol variando de 0 a 100%), por se tratarem de solventes “verdes”. Para promover a estabilidade dos compostos antociânicos, os solventes foram acidificados (pH 3) com ácido cítrico, o que é permitido na indústria alimentar em níveis “*Quantum satis*” (Regulamento (UE) n° 1129/2011, 2011).

4.1.2 Modelos de superfície de resposta teórica dos critérios de resposta utilizados para a análise de RSM e verificação estatística

A metodologia de superfície de resposta (RSM) é uma ferramenta útil para avaliar os efeitos de múltiplas variáveis e as suas interações em uma ou mais respostas, como a extração de antocianinas. O CCCD é uma forma popular de RSM e tem sido aplicado por vários investigadores na otimização de diversos métodos de processamento de alimentos (Bezerra et al., 2008). A **Figura 6** ilustra um resumo abrangente das diferentes etapas realizadas na otimização da recuperação de antocianinas do epicarpo de frutos de *P. spinosa*.

A cianidina 3-rutinósido ($[M+H]^+$ at m/z 595) e a peonidina 3-rutinósido ($[M+H]^+$ at m/z 609) foram as antocianinas identificadas por HPLC-DAD-ESI/MS no epicarpo de frutos de *P. spinosa*, sendo a primeira presente em maior quantidade (**Figura 5**). Num estudo anterior, estes compostos antociânicos também foram identificados em extratos de frutos inteiros de *P. spinosa*, em quantidades predominantes (Guimarães et al., 2013). Considerando que a capacidade corante destes extratos pode ser atribuída principalmente aos compostos referidos, a metodologia CCCD descrita foi aplicada no presente trabalho com a finalidade de maximizar a sua extração.

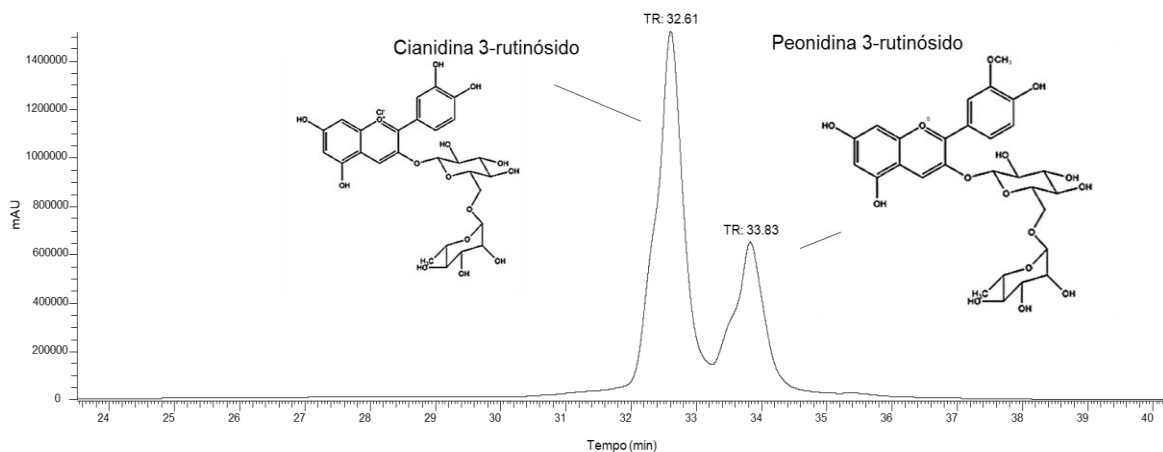


Figura 5: Representação do perfil cromatográfico dos compostos cianidina 3-rutinósido e peonidina 3-rutinósido do extrato do epicarpo dos frutos de *P. spinosa*, obtido por HPLC-DAD a 520 nm. O tempo de retenção (TR) é apresentado junto ao pico.

Os formatos de resposta utilizados para otimizar a extração de antocianinas (Y_1 , mg C/g R; Y_2 , mg C/g E dw e *Rendimento*, %), para cada uma das técnicas de extração aplicadas (HAE e UAE), de acordo com o CCD são mostrados na **Tabela 4**. Os valores paramétricos do modelo polinomial de segunda ordem da Eq. (1) obtidos após o ajuste dos valores do formato de resposta de extração e as informações estatísticas correspondentes ($\alpha = 0,05$) são apresentadas na **Tabela 5**. O procedimento de ajuste da Eq. (1) aplicado às respostas experimentais foi realizado usando estimativas de mínimos quadrados não lineares. Os valores considerados não significativos (ns) foram excluídos.

A análise de regressão mostrou um efeito positivo e altamente significativo dos termos lineares de T e P , e um efeito negativo muito significativo do termo quadrático de S . O termo quadrático de P afetou moderadamente o processo estudado. Em geral, o aumento de S causa uma diminuição na eficiência de extração, mas o seu efeito interativo com t e T (HAE) ou P (UAE) causa uma influência mais favorável, especialmente na HAE. Portanto, a equação preditiva final para descrever a extração de compostos totais usando termos significativos é apresentada na **Tabela 6**.

Uma vez que os modelos são validados por análise estatística (**Tabela 5**), é possível determinar os valores ótimos absolutos/relativos das condições variáveis para maximizar as respostas individualmente e globalmente, a fim de obter as condições de extração mais eficientes. A **Tabela 7** mostra os valores de resposta ótima individual e global e as condições correspondentes para as técnicas de extração HAE e UAE de acordo com os três formatos de valores de resposta (Y_1 , mg C/g R; Y_2 , mg C/g E dw e *Rendimento*, %) para cada antocianina avaliada (C1 e C2), e para o conteúdo total de antocianinas (CT = C1 + C2).



Embora os valores paramétricos mostram as respostas que possam ser usados para entender os padrões das respostas, a melhor forma de expressar os efeitos de qualquer variável independente na extração de qualquer tipo de resposta é gerar gráficos de superfície 3D e/ou de contorno, variando duas variáveis na faixa experimental sob estudo e mantendo as outras variáveis no seu nível ótimo. A este respeito, a **Figura 7** e a **Figura 8** mostram os gráficos 3D de superfície de resposta e os gráficos de contorno, respectivamente, representando a influência dos efeitos estudados dos parâmetros HAE e UAE no comportamento de extração. Os gráficos permitem visualizar a influência e interação entre as variáveis. A análise visual dos gráficos de superfície 3D e de contorno está de acordo com os valores paramétricos derivados da análise de regressão múltipla, conforme descrito na **Tabela 5** e na **Tabela 6**. A seção a seguir descreverá os padrões de resposta.

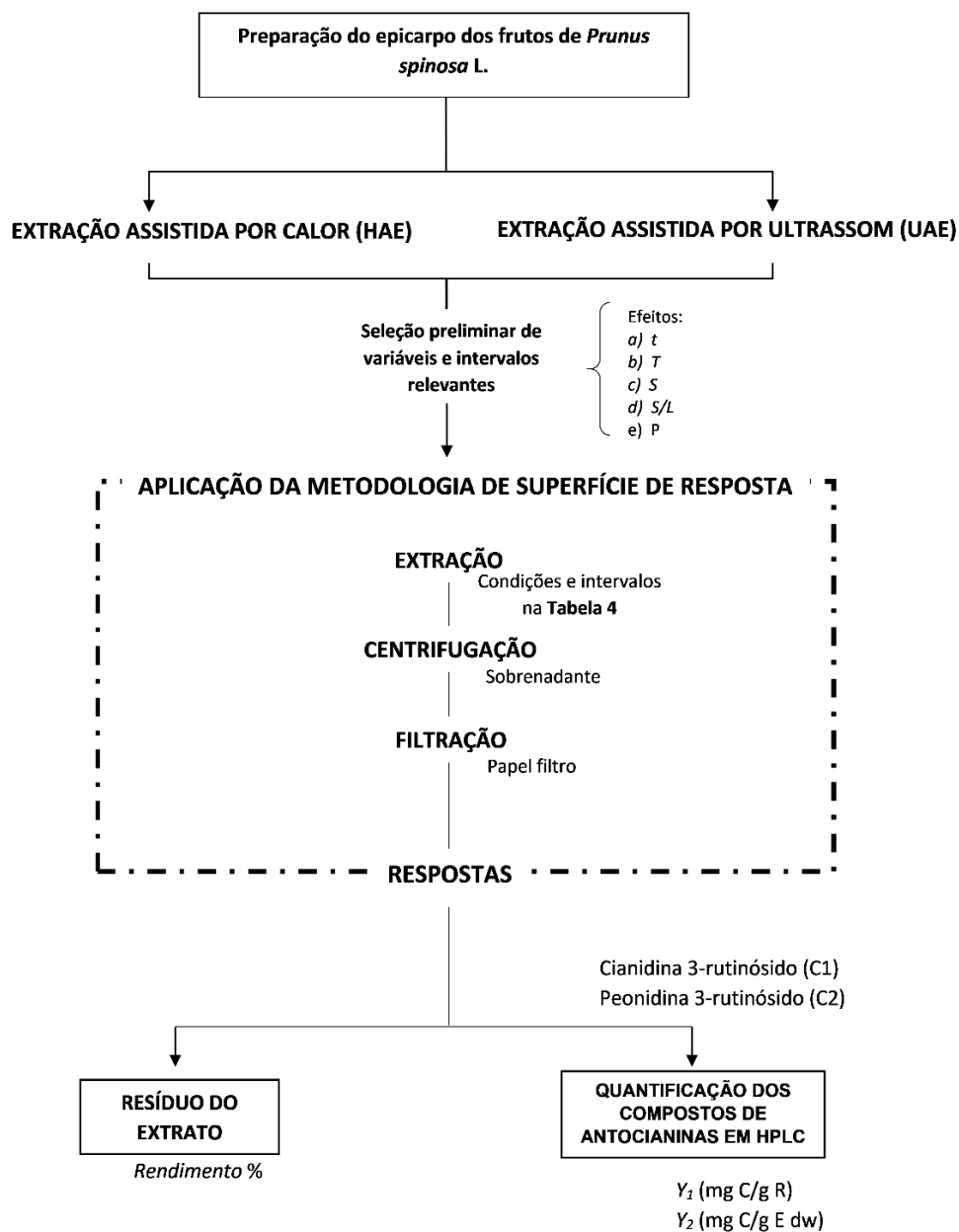


Figura 6: Diagrama das diferentes etapas executadas para otimizar as condições que maximizam as respostas de extração (Y_1 , mg C/g R e Y_2 , mg C/g E dw) de antocianinas e o resíduo total extraído (Rendimento, %).



Tabela 4: Resultados experimentais de RSM do CCCD para a otimização das três principais variáveis envolvidas (X_1 , X_2 e X_3) na HAE e na UAE para os três formatos de valores de resposta avaliados (Y_1 , mg C/g R; Y_2 , mg C/g E dw e *Rendimento*, %). Descrição de variáveis, valores naturais e intervalos. Três repetições foram realizadas para cada condição e para cada técnica.

DESENHO EXPERIMENTAL				HAE				UAE				HAE				UAE							
VALORES CODIFICADOS			HAE			UAE			RESÍDUO	CONTEÚDO INDIVIDUAL				CONTEÚDO TOTAL		RESÍDUO	CONTEÚDO INDIVIDUAL				CONTEÚDO TOTAL		
X_1	X_2	X_3	$X_1: t$ min	$X_2: T$ °C	$X_3: S$ %	$X_1: t$ min	$X_2: P$ W	$X_3: S$ %	Rendimento %	Y_1C1 mg/g R	Y_1C2 mg/g R	Y_2C1 mg/g E	Y_2C2 mg/g E	Y_1CT mg/g R	Y_2CT mg/g E	Rendimento %	Y_1C1 mg/g R	Y_1C2 mg/g R	Y_2C1 mg/g E	Y_2C2 mg/g E	Y_1CT mg/g R	Y_2CT mg/g E	
1	-1	-1	-1	21,2	34,2	20,3	9,1	160,8	20,3	53,75	6,65	3,04	3,58	1,64	9,73	5,21	61,24	9,26	3,65	5,67	2,24	12,91	7,91
2	-1	-1	1	21,2	34,2	79,7	9,1	160,8	79,7	45,43	7,54	4,65	3,42	2,11	12,22	5,54	52,87	9,45	4,44	5,00	2,35	13,89	7,34
3	-1	1	-1	21,2	75,8	20,3	9,1	339,2	20,3	57,26	6,08	2,81	3,48	1,61	8,78	5,09	70,17	8,96	3,44	6,29	2,41	12,40	8,70
4	-1	1	1	21,2	75,8	79,7	9,1	339,2	79,7	48,85	8,35	4,44	4,08	2,17	12,74	6,25	58,80	9,36	4,51	5,50	2,65	13,87	8,15
5	1	-1	-1	68,8	34,2	20,3	20,9	160,8	20,3	55,45	6,88	2,90	3,82	1,61	9,66	5,42	59,12	10,66	3,69	6,30	2,18	14,35	8,48
6	1	-1	1	68,8	34,2	79,7	20,9	160,8	79,7	50,00	10,05	4,05	5,03	2,02	14,03	7,05	55,22	8,99	4,14	4,97	2,29	13,14	7,25
7	1	1	-1	68,8	75,8	20,3	20,9	339,2	20,3	60,18	6,72	2,81	4,04	1,69	9,37	5,73	67,05	8,79	2,86	5,90	1,92	11,65	7,82
8	1	1	1	68,8	75,8	79,7	20,9	339,2	79,7	53,09	11,01	4,39	5,84	2,33	15,26	8,17	57,19	8,69	4,24	4,97	2,42	12,92	7,39
9	-1,68	0	0	5	55	50	5	250	50	53,88	8,15	3,80	4,39	2,05	12,01	6,44	68,58	10,53	4,77	7,22	3,27	15,30	10,49
10	1,68	0	0	85	55	50	25	250	50	56,51	9,09	3,70	5,14	2,09	12,74	7,23	56,13	10,14	4,56	5,69	2,56	14,71	8,25
11	0	-1,68	0	45	20	50	15	100	50	49,49	11,09	4,70	5,49	2,33	15,59	7,82	55,99	12,41	5,45	6,95	3,05	17,86	10,00
12	0	1,68	0	45	90	50	15	400	50	60,78	8,68	3,42	5,27	2,08	11,96	7,36	76,95	10,60	4,40	8,16	3,38	15,00	11,54
13	0	0	-1,68	45	55	0	15	250	0	54,73	3,81	1,63	2,09	0,89	5,46	2,98	50,18	8,22	1,92	4,12	1,19	10,14	5,31
14	0	0	1,68	45	55	100	15	250	100	47,62	5,68	2,69	2,70	1,28	8,23	3,99	34,40	11,06	1,15	3,81	0,39	12,21	4,20
15	-1,68	-1,68	-1,68	5	20	0	5	100	0	54,39	4,24	1,85	2,30	1,01	6,01	3,31	47,94	8,15	3,73	3,91	1,79	11,88	5,69
16	-1,68	-1,68	1,68	5	20	100	5	100	100	36,34	2,45	1,65	0,89	0,60	4,12	1,49	33,12	6,25	1,50	2,07	0,50	7,75	2,57
17	-1,68	1,68	-1,68	5	90	0	5	400	0	56,79	3,53	1,59	2,00	0,90	5,13	2,90	61,16	10,89	4,46	6,66	2,73	15,36	9,39
18	-1,68	1,68	1,68	5	90	100	5	400	100	47,24	4,51	2,39	2,13	1,13	6,88	3,26	28,92	11,57	4,64	3,34	1,34	16,21	4,69
19	1,68	-1,68	-1,68	85	20	0	25	100	0	51,72	4,45	2,00	2,30	1,03	6,40	3,33	45,30	9,99	4,55	4,53	2,06	14,54	6,59
20	1,68	-1,68	1,68	85	20	100	25	100	100	39,88	4,46	1,75	1,78	0,70	6,21	2,48	28,91	9,60	1,71	2,78	0,50	11,31	3,27
21	1,68	1,68	-1,68	85	90	0	25	400	0	64,04	2,14	0,78	1,37	0,50	2,95	1,87	51,96	9,85	3,88	5,12	2,02	13,73	7,13
22	1,68	1,68	1,68	85	90	100	25	400	100	61,84	6,75	2,82	4,17	1,74	9,54	5,91	23,34	10,08	3,72	2,35	0,87	13,80	3,22
23	0	0	0	45	55	50	15	250	50	56,07	8,65	3,78	4,85	2,12	12,53	6,97	65,72	10,85	4,50	7,13	2,96	15,35	10,08
24	0	0	0	45	55	50	15	250	50	56,55	8,79	4,13	4,97	2,34	13,00	7,31	65,90	10,93	4,34	7,20	2,86	15,27	10,06
25	0	0	0	45	55	50	15	250	50	54,57	8,99	4,09	4,91	2,23	13,22	7,14	66,06	10,44	4,04	6,89	2,67	14,47	9,56
26	0	0	0	45	55	50	15	250	50	54,35	8,65	3,78	4,70	2,05	12,36	6,76	67,94	11,08	4,35	7,53	2,96	15,43	10,48
27	0	0	0	45	55	50	15	250	50	54,57	9,26	4,20	5,02	2,27	13,33	7,14	67,80	10,27	4,09	6,96	2,77	14,36	9,74
28	0	0	0	45	55	50	15	250	50	54,35	9,12	4,18	5,02	2,30	13,37	6,76	68,10	10,26	3,92	6,99	2,67	14,18	9,66



Tabela 5: Resultados paramétricos da equação polinomial de segunda ordem da Eq. (1) para as técnicas de HAE e UAE avaliadas e em termos do comportamento de extração dos três formatos de valores de resposta (Y_1 , mg C/g R; Y_2 , mg C/g E dw e *Rendimento*,%), de acordo com o CCCD com 5 níveis (**Tabela 4**). O subscrito paramétrico 1, 2 e 3 representa as variáveis envolvidas t (X_1), T ou P (X_2) e S (X_3), respectivamente. A análise de significância dos parâmetros ($\alpha = 0,05$) é apresentada em valores codificados. Além disso, é apresentada a informação estatística do procedimento de adaptação ao modelo.

PARÂMETROS	RESÍDUO		CONTEÚDO INDIVIDUAL				CONTEÚDO TOTAL	
		<i>Rendimento</i>	Y_1C1	Y_1C2	Y_2C1	Y_2C2	Y_1CT	Y_2CT
HAE								
Ordenada na origem	b_0	54,86±0,72	9,35±0,38	4,15±0,19	5,07±0,17	2,26±0,08	13,48±0,55	7,29±0,23
Efeito linear	b_1	1,54±0,43	0,33±0,21	ns	0,25±0,09	ns	0,28±0,21	0,26±0,13
	b_2	3,12±0,43	ns	ns	0,15±0,09	0,05±0,02	ns	0,19±0,13
	b_3	-3,07±0,43	0,56±0,21	0,33±0,11	0,17±0,09	0,11±0,05	0,88±0,31	0,27±0,13
Efeito quadrático	b_{11}	ns	-0,26±0,21	-0,09±0,07	-0,10±0,05	-0,05±0,03	-0,35±0,26	-0,16±0,15
	b_{22}	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	b_{33}	-1,24±0,42	-1,60±0,26	-0,69±0,13	-0,94±0,11	-0,40±0,06	-2,26±0,37	-1,33±0,15
Efeito interativo	b_{12}	0,78±0,31	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	b_{13}	0,54±0,31	0,26±0,15	0,04±0,02	0,18±0,07	0,04±0,03	0,31±0,22	0,22±0,09
	b_{23}	0,69±0,31	0,31±0,15	0,14±0,08	0,21±0,07	0,09±0,03	0,45±0,22	0,29±0,09
Estatísticas (R^2)		0,9375	0,9100	0,8755	0,9443	0,9272	0,9046	0,9489
UAE								
Ordenada na origem	b_0	68,11±1,70	10,42±0,47	4,10±0,28	6,98±0,22	2,83±0,13	14,46±0,62	9,75±0,31
Efeito linear	b_1	-1,70±0,96	ns	ns	-0,13±0,12	-0,10±0,07	ns	-0,22±0,17
	b_2	2,12±0,96	0,23±0,21	0,18±0,15	0,25±0,12	0,14±0,07	0,37±0,35	0,36±0,17
	b_3	-6,46±0,96	ns	-0,16±0,15	-0,55±0,12	-0,26±0,07	ns	-0,82±0,17
Efeito quadrático	b_{11}	-2,29±1,16	ns	0,26±0,20	-0,13±0,11	ns	ns	ns
	b_{22}	ns	ns	0,35±0,20	ns	0,19±0,09	0,66±0,42	0,27±0,21
	b_{33}	-7,33±1,16	-0,36±0,27	-0,84±0,20	-1,02±0,15	-0,68±0,09	-1,22±0,42	-1,84±0,21
Efeito interativo	b_{12}	ns	-0,34±0,20	-0,11±0,11	-0,18±0,09	-0,07±0,05	-0,46±0,25	-0,23±0,12
	b_{13}	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	b_{23}	-1,29±0,69	0,17±0,10	0,22±0,11	-0,08±0,05	ns	0,41±0,25	ns
Estatísticas (R^2)		0,9431	0,7825	0,9032	0,9316	0,9035	0,8986	0,9380



Tabela 6: Modelos matemáticos do processo de extração derivados do modelo polinomial de segunda ordem com interação descrita na Eq. (1) em termos dos valores codificados.

Para o formato de resposta Y_1 (mg C/g R):		
	Cianidina 3-rutinósido (C1): $HAE_{Y_1}^{C_1} = 9,35 + 0,33t + 0,56S - 0,26t^2 - 1,60S^2 + 0,26tS + 0,31TS$	Eq.(2)
HAE	Peonidina 3-rutinósido (C2): $HAE_{Y_1}^{C_2} = 4,15 + 0,33S - 0,09t^2 - 0,69S^2 + 0,04tS + 0,14TS$	Eq.(3)
	CT (C1+C2): $HAE_{Y_1}^{C_T} = 13,48 + 0,28t + 0,88S - 0,35t^2 - 2,26S^2 + 0,31tS + 0,45TS$	Eq.(4)
<hr/>		
	Cianidina 3-rutinósido (C1): $UAE_{Y_1}^{C_1} = 10,42 + 0,23P - 0,36S^2 - 0,34tP + 0,17PS$	Eq.(5)
UAE	Peonidina 3-rutinósido (C2): $UAE_{Y_1}^{C_2} = 4,10 + 0,18P - 0,16S + 0,26t^2 + 0,35P^2 - 0,84S^2 - 0,11tP + 0,22PS$	Eq.(6)
	CT (C1+C2): $UAE_{Y_1}^{C_T} = 14,46 + 0,37P + 0,66P^2 - 1,22S^2 - 0,46tP + 0,41PS$	Eq.(7)
Para o formato de resposta Y_2 (mg C/g E dw):		
	Cianidina 3-rutinósido (C1): $HAE_{Y_2}^{C_1} = 5,07 + 0,25t + 0,15T + 0,17S - 0,10t^2 - 0,94S^2 + 0,18tS + 0,21TS$	Eq.(8)
HAE	Peonidina 3-rutinósido (C2): $HAE_{Y_2}^{C_2} = 2,26 + 0,05T + 0,11S - 0,05t^2 - 0,40S^2 + 0,04tS + 0,09TS$	Eq.(9)
	CT (C1+C2): $HAE_{Y_2}^{C_T} = 7,29 + 0,26t + 0,19T + 0,27S - 0,16t^2 - 1,33S^2 + 0,22tS + 0,29TS$	Eq.(10)
<hr/>		
	Cianidina 3-rutinósido (C1): $UAE_{Y_2}^{C_1} = 6,98 - 0,13t + 0,25P - 0,55S - 0,13t^2 - 1,02S^2 - 0,18tP - 0,08PS$	Eq.(11)
UAE	Peonidina 3-rutinósido (C2): $UAE_{Y_2}^{C_2} = 2,83 - 0,10t + 0,14P - 0,26S + 0,19P^2 - 0,68S^2 - 0,07tP$	Eq.(12)
	CT (C1+C2): $UAE_{Y_2}^{C_T} = 9,75 - 0,22t + 0,36P - 0,82S + 0,27P^2 - 1,84S^2 - 0,23tP$	Eq.(13)
Para o formato de resposta <i>Rendimento</i> (%):		
HAE	<i>Rendimento</i> : $HAE_{Rendimento} = 54,86 + 1,54t + 3,12T - 3,07S - 1,24S^2 + 0,78tT + 0,54tS + 0,69TS$	Eq.(14)
UAE	<i>Rendimento</i> : $UAE_{Rendimento} = 68,11 - 1,70t + 2,12P - 6,46S - 2,29t^2 - 7,33S^2 - 1,29PS$	Eq.(15)



Tabela 7: Condições das variáveis em valores naturais que levam a valores ótimos de resposta para RSM usando um CCD para cada uma das técnicas de extração avaliadas (HAE e UAE), para os três formatos de valores de resposta (Y_1 , mg C/g R; Y_2 , mg C/g E dw; e *Rendimento*,%) para cada composto avaliado (C1 e C2) e para o total de compostos (CT = C1 + C2).

CRITÉRIO	CONDIÇÕES VARIÁVEIS ÓTIMAS			RESPOSTA OTIMIZADA			
	X_1 : t (min)	X_2 : T (°C) ou P(W)	X_3 : S (%)				
A) Condições variáveis ótimas individuais							
HAE	<i>Rendimento</i>	85,00±8,50	90,00±4,50	38,01±3,04	65,10±3,91	%	
	Y_1	C1	64,89±5,19	90,00±8,10	62,01±3,10	9,71±0,49	mg C1/g R
		C2	47,18±3,30	90,00±7,20	62,22±6,22	4,27±0,34	mg C2/g R
		CT	58,85±5,89	90,00±9,00	61,97±6,20	13,89±0,14	mg CT/g R
	Y_2	C1	84,27±0,84	90,00±3,60	63,11±3,79	5,64±0,51	mg C1/g E dw
		C2	48,06±1,92	90,00±0,90	59,98±3,60	2,38±0,21	mg C2/g E dw
		CT	70,76±5,66	90,00±4,50	60,82±3,04	7,89±0,55	mg CT/g E dw
	UAE	<i>Rendimento</i>	12,79±0,51	400,00±32,00	32,51±1,95	74,53±2,24	%
		Y_1	C1	5,00±0,10	400,00±28,00	61,80±1,85	11,82±0,71
C2			5,00±0,10	400,00±28,00	53,58±1,07	6,45±0,45	mg C2/g R
CT			5,00±0,10	400,00±20,00	58,39±4,09	18,32±1,47	mg CT/g R
Y_2		C1	5,00±0,50	400,00±4,00	40,11±2,81	7,88±0,16	mg C1/g E dw
		C2	5,00±0,40	400,00±28,00	44,35±4,43	3,96±0,28	mg C2/g E dw
		CT	5,00±0,35	400,00±20,00	43,37±4,34	12,23±0,86	mg CT/g E dw
B) Condições variáveis ótimas globais							
HAE		<i>Rendimento</i>				50,89±3,05	%
	Y_1	C1			9,71±0,29	mg C1/g R	
		C2			4,22±0,13	mg C2/g R	
		CT	49,02±2,94	90,00±7,20	50,00±0,50	13,93±0,42	mg CT/g R
	Y_2	C1			5,57±0,11	mg C1/g E dw	
		C2			2,36±0,05	mg C2/g E dw	
CT				7,93±0,08	mg CT/g E dw		
UAE	<i>Rendimento</i>				68,60±2,06	%	
	Y_1	C1			11,74±0,23	mg C1/g R	
		C2			6,43±0,32	mg C2/g R	
		CT	5,00±0,15	400,00±32,00	47,98±2,88	18,17±1,82	mg CT/g R
	Y_2	C1			7,81±0,47	mg C1/g E dw	
		C2			3,95±0,24	mg C2/g E dw	
CT				11,76±0,82	mg CT/g E dw		



RENDIMENTO

RESÍDUO (Y_1)

EPICARPO (Y_2)

HAE

UAE

HAE

UAE

HAE

UAE

A: RESPOSTA CONJUNTA

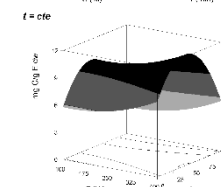
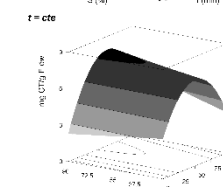
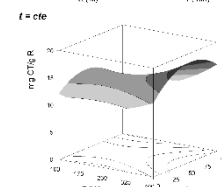
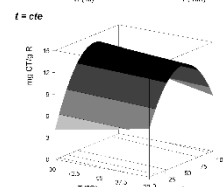
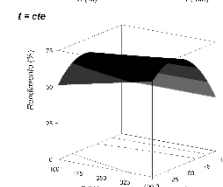
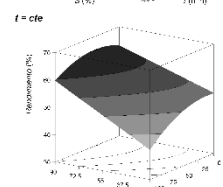
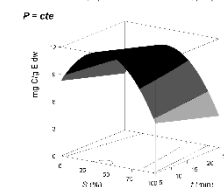
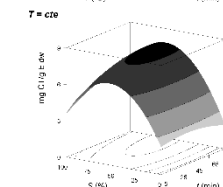
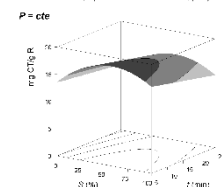
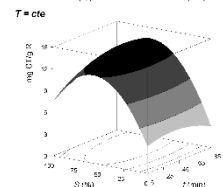
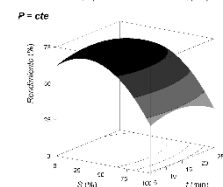
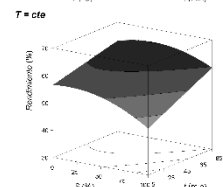
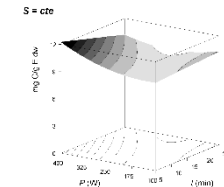
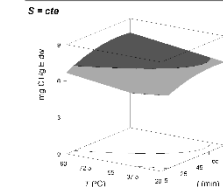
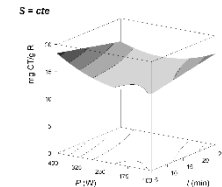
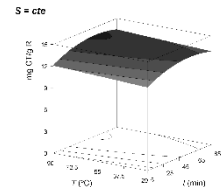
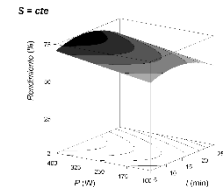
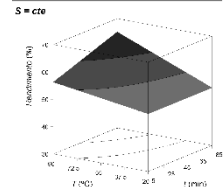
A: RESPOSTA CONJUNTA

A: RESPOSTA CONJUNTA

A: RESPOSTA CONJUNTA

A: RESPOSTA CONJUNTA

A: RESPOSTA CONJUNTA



B: DISTRIBUIÇÃO ESTATÍSTICA

B: DISTRIBUIÇÃO ESTATÍSTICA

B: DISTRIBUIÇÃO ESTATÍSTICA

B: DISTRIBUIÇÃO ESTATÍSTICA

B: DISTRIBUIÇÃO ESTATÍSTICA

B: DISTRIBUIÇÃO ESTATÍSTICA

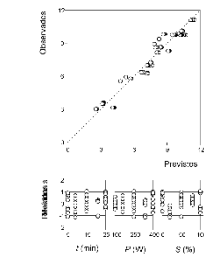
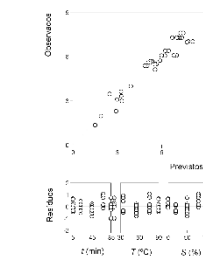
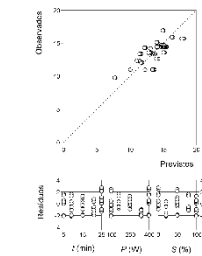
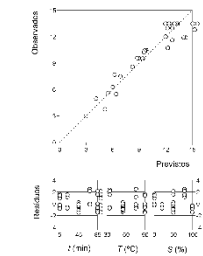
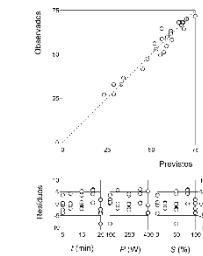
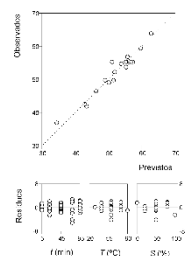


Figura 7: Mostra os resultados gráficos do HAE e UAE para o rendimento de extração do material residual obtido e o total de antocianinas detectados em termos de dois formatos de resposta (Y_1 , mg C/g R e Y_2 , mg C/g E dw). Cada figura é dividida em duas partes. *Parte A:* Mostra a análise gráfica por superfícies de rede que representa a superfície de resposta 3D prevista com o polinômio de segunda ordem da Eq. (1). As ações binárias entre as variáveis são apresentadas quando a variável excluída é posicionada no ótimo individual (Tabela 7). *Parte B:* ilustra a adequação do ajuste, sendo usados dois critérios gráficos básicos de estatística. O primeiro é a capacidade de simular as mudanças da resposta entre os dados previstos e observados; e o segundo, a distribuição residual em função de cada uma das variáveis.

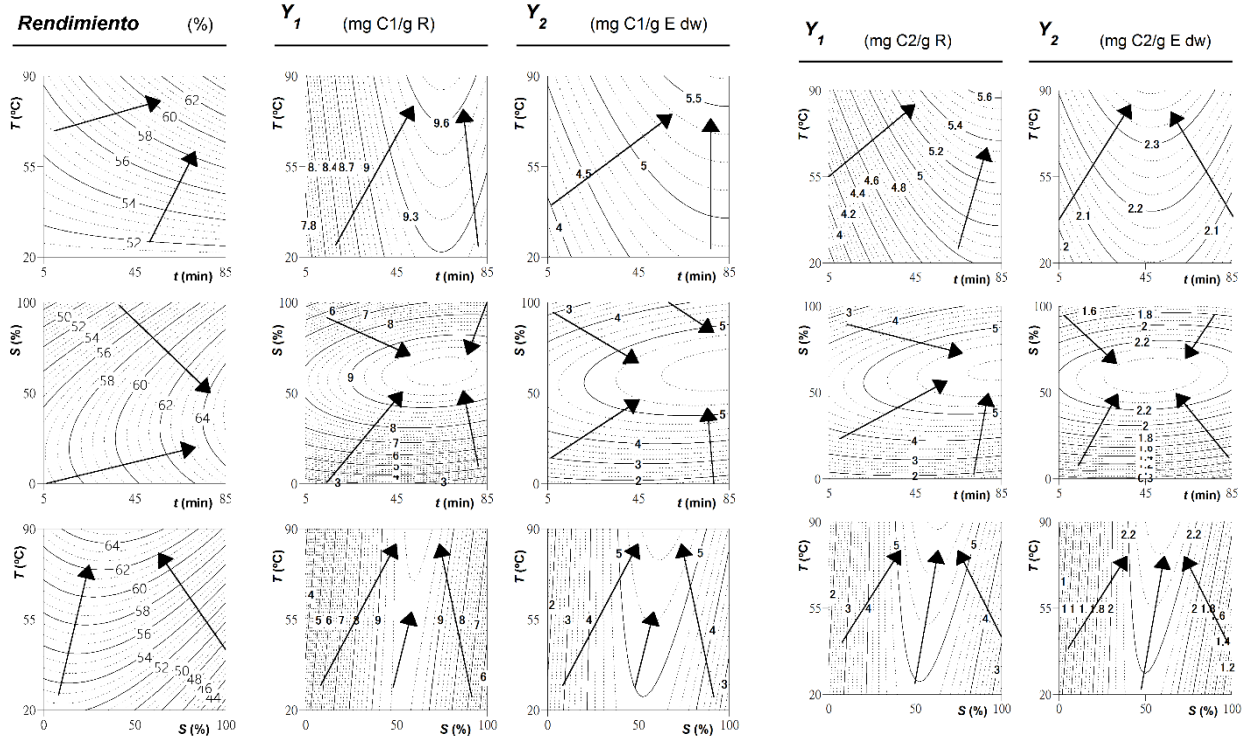


RENDIMENTO

C1

C2

HAE



UAE

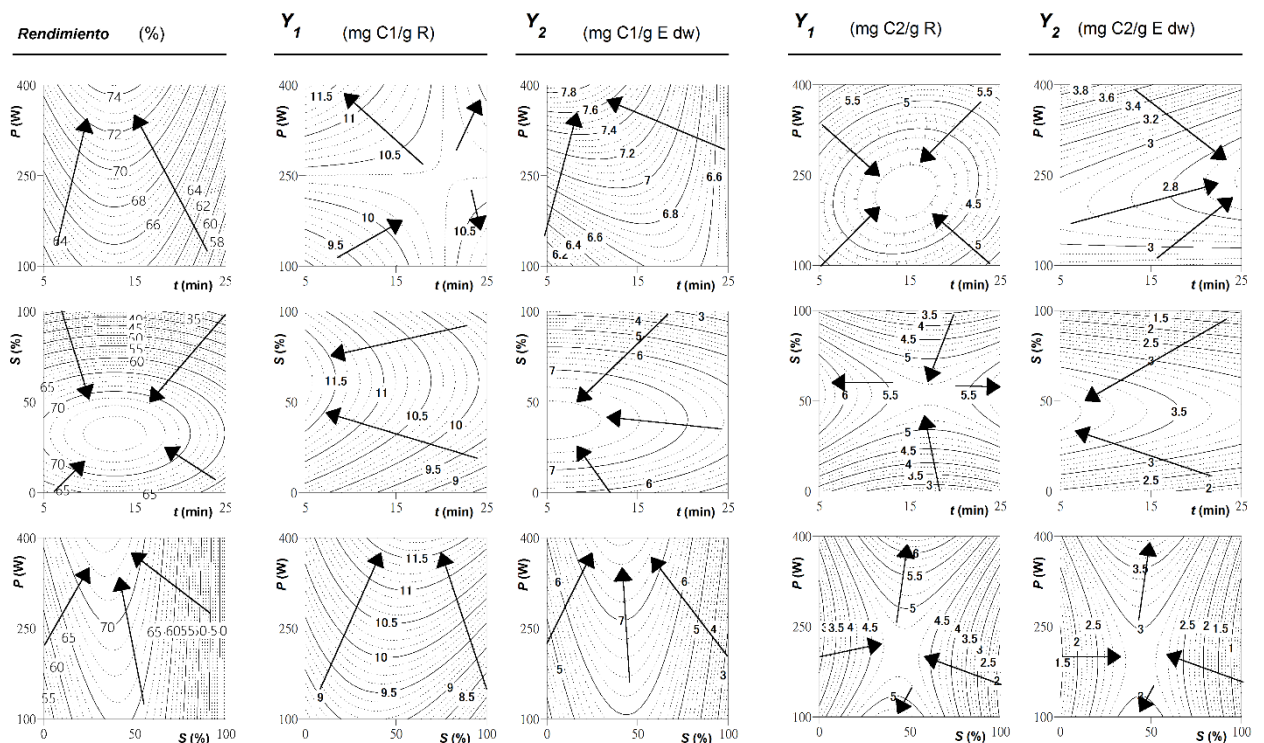


Figura 8: Mostra as projeções de isolinhas otimizadas para a extração de C1 e C2 em função da combinação das três principais variáveis envolvidas (X_1 , X_2 e X_3) na HAE e UAE. Para cada composto, os dois formatos de valores de resposta (Y_1 , mg C/g R e Y_2 , mg C/g E dw) são apresentados para descrever visualmente as tendências de cada resposta e guiar a seleção das condições mais favoráveis, considerando simultaneamente todas as respostas. Adicionalmente, apresentam-se as projeções de isolinhas do rendimento do material residual extraído. Cada um dos gráficos de contorno representa a projeção no plano XY da superfície de resposta tridimensional teórica prevista com o polinômio de segunda ordem da Eq. (1). As ações binárias entre as variáveis são apresentadas quando a variável excluída é posicionada no ótimo individual (Tabela 7).



4.1.3 Efeito das variáveis de extração nas respostas-alvo

Os resultados de extração para HAE e UAE, em função da combinação das três principais variáveis envolvidas (X_{1-3} : t , T ou P , e S), podem ser observados na **Figura 7** e na **Figura 8**. De uma forma mais detalhada, a **Figura 7** mostra os gráficos de superfície 3D do R extraído (*Rendimento*, %) e dos CT, em dois formatos de resposta (Y_1 , mg CT/g R e Y_2 , mg CT/g E dw). Por outro lado, a **Figura 8** mostra as projeções de isolinhas otimizadas para a extração de C1 (cianidina 3-rutinósido) e C2 (peonidina 3-rutinósido), nos dois formatos de valores de resposta (Y_1 , mg C/g R e Y_2 , mg C/g E dw), além do *Rendimento* (%) em termos dos CT. Estas figuras mostram, respetivamente, resultados gráficos em 3D e projeções de isolinhas otimizadas para as antocianinas extraídas (C1 ou C2) em função das três variáveis combinadas (t , T ou P , e S) em HAE e UAE. As antocianinas totais (C1 + C2) são contabilizadas juntas (CT) na **Figura 7**, e individualmente na **Figura 8**. Estas são úteis para visualizar as tendências de cada resposta e guiar a seleção das condições mais favoráveis, considerando simultaneamente todas as respostas. Adicionalmente, a **Figura 7B** ilustra a capacidade de prever os resultados obtidos e a distribuição dos resíduos em função de cada uma das variáveis consideradas.

No HAE, foi possível perceber pequenas diferenças entre o comportamento de extração das duas antocianinas consideradas (ao comparar C1 e C2, ou Y_1 e Y_2). O oposto ocorreu no UAE, onde os efeitos foram distintos para cada uma das antocianinas consideradas, e também de acordo com o formato da resposta. No entanto, para ambas as técnicas de extração utilizadas, a variável S foi a mais significativa, impactando os níveis de antocianinas extraídas. Em termos estatísticos, a distribuição dos valores residuais (**Figura 7**) apresenta, para a maioria dos casos, mais de 90% de confiabilidade, mostrando uma boa concordância entre os valores experimentais e os previstos. Isto também é verificado pelos altos valores de R^2 alcançados (**Tabela 5**), que indicam a percentagem de variabilidade explicada pelo modelo.

O efeito negativo dos termos quadráticos de S pode ser observado em todas as parcelas. O teor de etanol indica um ponto de cambio, e o maior rendimento é observado com aproximadamente 50% de etanol. O impacto negativo do termo quadrático do teor de etanol pode ser explicado pelo fato de a adição de água ao etanol melhorar a extração de compostos. O efeito negativo da interação entre T e S ou P e S , pode sugerir que o uso



posterior de menor energia, em combinação com maior S , evitará a degradação das antocianinas. Superfícies inclinadas ao lado da T ou P mais alta estão de acordo com a afirmação de que energias mais altas, podem aumentar a solubilidade dos compostos alvo e, conseqüentemente, melhorar a sua libertação para a matriz da amostra, destruindo a integridade dos tecidos conjuntivos e estruturais, como já descrito por outros autores (Oludemi et al., 2018; Pinela et al., 2016; Roriz, Barros, Prieto, Barreiro, et al., 2017).

4.1.4 Condições ótimas numéricas que maximizam a extração e verificação experimental de modelos de previsão

O objetivo deste estudo foi maximizar o rendimento de extração de antocianinas do epicarpo de frutos de *P. spinosa* através das técnicas de HAE e UAE, dentro da faixa de parâmetros de extração escolhida. Com base nos resultados experimentais e análise estatística, foram realizadas otimizações numéricas para estabelecer o nível ótimo das variáveis independentes com níveis de resposta desejáveis. Para verificar o modelo matemático preditivo do processo estudado, a confirmação experimental foi realizada nas condições ótimas estimadas. Os resultados previstos coincidiram com os resultados experimentais obtidos nas condições ótimas de extração, que foram validados pelo modelo RSM com uma boa correlação. Os valores das condições variáveis que levam a valores de resposta ótima para RSM usando um CCCD para cada uma das técnicas de extração são apresentados na **Tabela 7**. Estes valores foram obtidos combinando as informações produzidas pelos três critérios de resposta (Y_1 , Y_2 e *Rendimento*) e considerando os dois compostos (C1 e C2). Esta tabela mostra as condições variáveis ótimas individuais e globais, para cada uma das técnicas estudadas, e a respectiva quantidade de antocianinas extraídas.

- Para a HAE: as condições variáveis ótimas globais foram encontradas em $49,02 \pm 2,94$ min, $90,00 \pm 7,20$ °C e $50,00 \pm 0,50\%$ de etanol, produzindo valores máximos de resposta de $13,93 \pm 0,42$ mg CT/g R (Y_1), $7,93 \pm 0,08$ mg CT/g E dw (Y_2) e $50,89 \pm 3,05\%$ (*Rendimento* do resíduo extraído);
- Para a UAE: as condições variáveis ótimas globais foram encontradas em $5,00 \pm 0,15$ min, $400,00 \pm 32,00$ W e $47,98 \pm 2,88\%$ de etanol, produzindo valores máximos de resposta de $18,17 \pm 1,82$ mg CT/g R (Y_1), $11,76 \pm 0,82$ mg CT/g E dw (Y_2) e $68,60 \pm 2,06$ % (*Rendimento* do resíduo extraído).



Considerando os valores individuais e globais, a maior quantidade de compostos extraídos foi obtida pela técnica de UAE. A concentração ideal do solvente foi quase a mesma e as duas técnicas exigiram valores elevados de energia, onde os maiores valores de T e P propostos pelo desenho experimental eram ótimos, mas a UAE precisou de menos t do que a HAE (~ 90% menos). Os resultados obtidos estão de acordo com conclusões encontradas anteriormente na literatura (Chemat et al., 2017; Montesano et al., 2008; Zhu et al., 2016), nas quais a UAE mostrou consumir menos energia devido ao menor t necessário, e fornecer valores de extração mais altos, aumentando a pureza e, adicionalmente, respeitando os requisitos de um conceito de extração verde.

A UAE é uma alternativa verde moderna para aplicações químicas baseadas em plantas que demonstrou ser uma alternativa economicamente viável às técnicas convencionais. Os principais benefícios da aplicação desta técnica são a redução do tempo, energia e solvente utilizado e, conseqüentemente, as emissões industriais (Chemat et al., 2017), que é o principal objetivo da química “verde” sustentável. O processo de extração é concluído em minutos com alta reprodutibilidade, simplificando a manipulação e a força de trabalho, originando produtos de maior pureza e eliminando tratamentos adicionais, contrariamente ao que ocorre em métodos convencionais de extração, como extrações por Soxhlet ou maceração (Chemat et al., 2017).

4.1.5 Análise de dose-resposta do efeito da relação sólido-líquido nas condições ótimas de extração

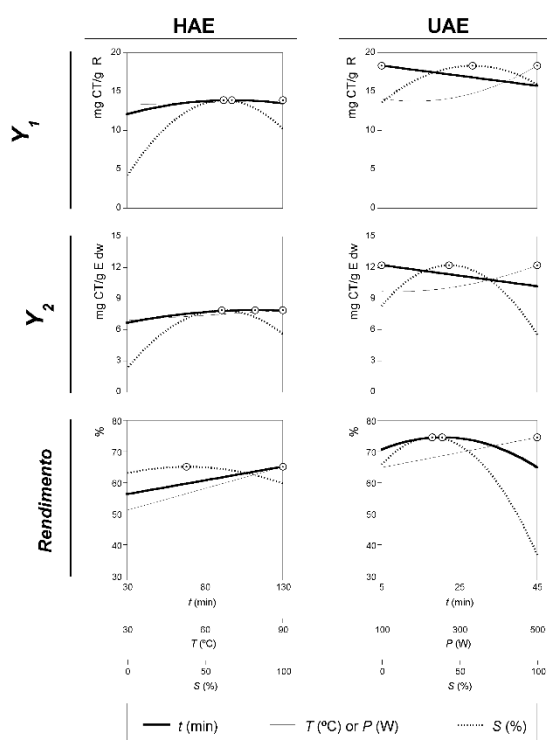
O estudo do efeito S/L foi realizado nas condições ótimas previstas pelos modelos polinomiais obtidos para cada técnica de extração (HAE e UAE), utilizando o teor total de antocianinas (CT), quantificado por um sistema de HPLC, como o fator de resposta (**Tabela 6**). O estudo individual S/L para cada antocianina (C1 ou C2) não foi apresentado porque o comportamento foi semelhante ao padrão da quantidade total. Em ambos os processos, o S/L foi projetado para verificar o comportamento entre 5 a 250 g/L. O valor máximo de 250 g/L foi utilizado como condição limite devido à impossibilidade de produzir uma extração homogeneizada quando se utilizaram valores superiores.

As dose-respostas obtidas do S/L foram consistentes para ambos os sistemas HAE e UAE, e poderiam ser descritas por uma relação linear simples (Parte B da **Figura 9**). Todos os pontos experimentais estão distribuídos em torno da equação com apenas uma variável independente e, conseqüentemente, a resposta à dose é explicada pelo declive



(m) da relação linear. Nenhum dos casos apresentou valores m positivos (a eficiência de extração aumenta à medida que a taxa S/L aumenta), dois casos apresentaram valores não significativos ou um valor zero de m (a eficiência não muda à medida que o S/L aumenta). Em todos os outros casos, o m apresentou valores negativos (a eficiência diminui à medida que o S/L aumenta). As respostas do formato de valor Y_1 , para HAE e UAE apresentaram valores não significativos de m , enquanto todas as outras respostas mostraram valores negativos significativos de m (Y_2 e *Rendimento* para HAE e UAE).

A: Variáveis RSM otimizadas



B: Padrões de relação sólido-líquido

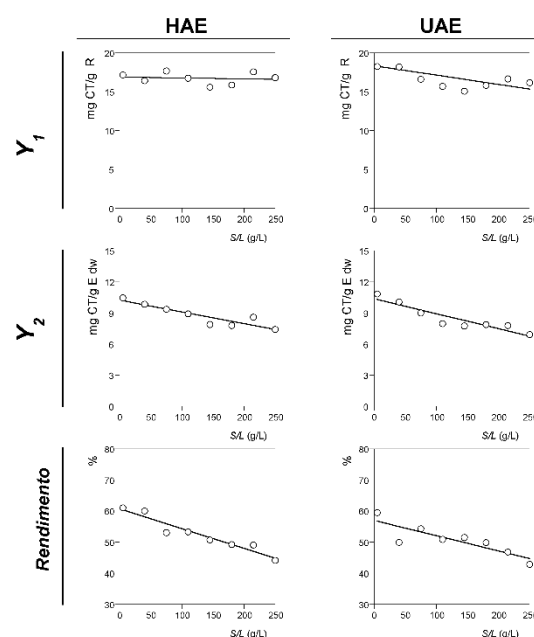


Figura 9: Resumo final dos efeitos de todas as variáveis avaliadas para os sistemas HAE e UAE. *Parte A:* Mostra as respostas 2D individuais de todas as respostas estudadas em função de todas as variáveis avaliadas. As variáveis em cada um dos gráficos 2D foram posicionadas nos valores ótimos individuais das restantes (Tabela 5). Os pontos (⊙) apresentados ao longo de cada linha destacam a localização do valor ótimo. Linhas e pontos são gerados pelo polinômio teórico de segunda ordem (Tabela 6). *Parte B:* Mostra a resposta à dose de S/L nos valores ótimos globais das outras três variáveis (Tabela 7). Os resultados experimentais são os pontos (○), enquanto as linhas são o padrão previsto pela Eq. (2). O valor limite (~ 250 g/L) mostra a concentração experimental máxima alcançada até que a amostra não possa ser fisicamente agitada em escala laboratorial.

As conclusões derivadas desta análise são descritas abaixo:

- Para o formato de valor Y_1 , a resposta do valor m paramétrico em HAE e UAE apresenta um intervalo de confiança não significativo, o que significa que as



mudanças na resposta não são estatisticamente suportadas e, portanto, o parâmetro deve ser considerado igual a zero. Resumindo, a quantidade de antocianinas no resíduo extraído não varia em função ao aumento de S/L . Os valores de extração foram definidos numericamente pelo valor paramétrico da ordenada na origem (b) da equação linear como: $14,85 \pm 2,29$ e $18,25 \pm 3,95$ mg CT/g R para HAE ($R^2 = 0,9920$) e UAE ($R^2 = 0,9817$), respectivamente.

- Para o formato de valor Y_2 , os valores paramétricos para o HAE foram $b = 9,21 \pm 1,37$ mg CT/g E dw e $m = -0,0113 \pm 0,0051$, com $R^2 = 0,9566$; enquanto para UAE, $b = 10,32 \pm 1,48$ mg CT/g E dw e $m = -0,0143 \pm 0,0038$, com $R^2 = 0,9244$. Valores negativos de m mostram que o aumento de S/L leva a uma diminuição na capacidade de extração, obtendo um valor máximo de extração a 5 g/L e um mínimo a 250 g/L. No entanto, a diminuição observada é pequena (menor que -0,02), o que significa que o aumento de 1 g/L implica a perda de $0,0113 \pm 0,0051$ mg CT/g E dw para o processo HAE e $0,0143 \pm 0,0038$ mg CT/g E dw para a UAE. Tais valores produzem perdas no valor experimental máximo testado (250 g/L) de ~ 15%, comparativamente ao extraído a 5 g/L. No entanto, as vantagens económicas de trabalhar a 250 g/L são muito superiores aos possíveis benefícios da extração no valor ideal de S/L .
- Para o formato de valor *Rendimento*, os valores paramétricos para o HAE foram $b = 54,62 \pm 4,87\%$ e $m = -0,0636 \pm 0,0123$, com $R^2 = 0,9516$; enquanto que para UAE, $b = 58,90 \pm 7,77\%$ e $m = -0,0491 \pm 0,0116$, com $R^2 = 0,9618$. Embora nos valores iniciais de S/L os resultados obtidos para HAE e UAE conduzissem a rendimentos de extração semelhantes, esses valores diminuíram à medida que o S/L aumentou. O valor paramétrico m é significativamente menor para o processo UAE, resultando em valores mais altos de rendimento de extração a 250 g/L. Estes resultados estão de acordo com as conclusões destacadas na literatura, onde a UAE é descrito como uma técnica que melhora o processo de extração pelo aumento da transferência de massa entre o material vegetal e o solvente (Tomšik et al., 2016). O colapso das bolhas de cavitação leva a um melhor rompimento celular, facilitando a liberação dos compostos, permitindo maior penetração do solvente na matriz da amostra e aumentando a área de superfície de contato entre as fases sólida e líquida (Chemat et al., 2017; Tomšik et al., 2016).



4.1.6 Comparação com outros estudos envolvendo a extração de antocianinas

Existem poucos trabalhos na literatura sobre antocianinas em frutos de *P. spinosa*. Num desses estudos, Guimarães et al., (2013) realizaram a extração utilizando metanol contendo 0,5% de TFA como solvente e identificaram 8 antocianinas diferentes, predominantemente peonidina 3-rutinósido e cianidina 3-rutinósido, com $34,47 \pm 0,03$ e $31,12 \pm 0,11 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ de fruta dw, respetivamente. Noutro estudo, Ganhão, Estévez, Kylli, Heinonen, & Morcuende (2010) encontraram $3,5 \pm 0,5 \text{ mg}$ de antocianinas/100 g dw de frutos de *P. spinosa*. Ambos os autores utilizaram o fruto inteiro, enquanto neste trabalho apenas se utilizou o epicarpo como material de extração, o que pode justificar as diferenças significativas entre os resultados encontrados, quando comparados com os do presente estudo. Em comparação com a polpa, o epicarpo dos frutos apresenta maior intensidade de cor e, assim, maior concentração de antocianinas, para além de apresentar menos compostos interferentes no processo de extração. Além disso, outro factor que contribuiu para a produção de grandes quantidades de antocianinas a partir do material extraído, foi a otimização do processo de extração, que levou ao aumento da eficiência e rendimento de extração. Pinacho, Cavero, Astiasarán, Ansorena, e Calvo (2015), também utilizaram frutos de *P. spinosa* como fonte de antocianinas e o teor total foi quantificado por métodos espectrofotométricos, apresentando valores que não podem ser comparados com os encontrados no presente estudo, pois a técnica de quantificação foi distinta.

Alguns exemplos de outras fontes de antocianinas à base de plantas são o farelo de *Oryza sativa* L. (var. Glutinosa), que contém 42,00 mg/g (Chen, McClung, & Bergman, 2017), a casca de *Phaseolus vulgaris* L. (feijão comum), apresentando 32,00 mg/g (Mojica, Berhow, & Gonzalez de Mejia, 2017), e frutos de *Rubus fruticosus* L. (amoras) que possuem 17,10 mg/g (Elisia, Hu, Popovich, & Kitts, 2006). Embora estes valores sejam ligeiramente superiores aos apresentados pelos frutos de *P. spinosa*, em geral, os referidos frutos e vegetais já possuem um alto valor comercial e outros fins industriais, ao contrário dos frutos de *P. spinosa*. Por outro lado, resíduos como o bagaço de uva (*Vitis vinifera* L.) e a casca de manga (*Mangifera indica*) apresentaram menores quantidades de antocianina, 6,33 mg/g (Bosiljkov et al., 2017) e 2,03 a 3,60 mg/g (Ajila, Naidu, Bhat, & Prasada Rao, 2007), respetivamente. Assim, estes frutos silvestres revelaram-se uma excelente fonte de antocianinas, servindo como matéria-prima alternativa para a produção de corantes naturais para fins comerciais.



4.2 Extrato corante à base de antocianinas do epicarpo de frutos de *Prunus spinosa* L., seguindo as condições ótimas, para estudos de bioatividade e de incorporação

Preparou-se o extrato de epicarpo de frutos de *P. spinosa* através da técnica de UAE conforme as condições ótimas de tempo, potência e concentração de solvente obtidas pelo processo de otimização, para posterior avaliação da bioatividade e incorporação num produto de confeitaria. Visto que o efeito da relação sólido-líquido foi praticamente linear, levando a perdas de compostos extraídos pouco significativas conforme o aumento da *S/L*, optou-se por utilizar um valor intermediário (75 g/L), conseguindo desta forma uma maior poupança de solvente, tempo e energia. Seguindo este procedimento, as quantidades de compostos antociânicos extraídos foram: $15,72 \pm 0,09$ mg CT/g R, $11,95 \pm 0,07$ mg CT/g E dw e $76,3 \pm 0,2$ % de *Rendimento*. Os parâmetros de cor do extrato foram obtidos por análise através de um colorímetro e encontram-se na **Tabela 8**, conforme os valores de espaço de cor CIE L^* (luminosidade), a^* (verde/vermelho) e b^* (azul/amarelo). Os valores CIE foram convertidos em valores RGB através de um programa (<<http://www.easyrgb.com/en/convert.php>>), onde se pode visualizar a cor obtida pelo extrato, que foi roxo-avermelhado.

Tabela 8: Quantidade de antocianinas (cianidina 3-rutinósido e peonidina 3-rutinósido) no resíduo e parâmetros de cor do extrato obtido nas condições ótimas (média \pm desvio padrão).

Quantificação (mg C/g R)	L^*	a^*	b^*	Cor da conversão em valores RGB
$15,72 \pm 0,09$	$23,0 \pm 0,1$	$2,71 \pm 0,01$	$1,17 \pm 0,01$	

4.3 Avaliação das propriedades bioativas do corante à base de antocianinas do epicarpo de frutos de *Prunus spinosa* L. obtido pelo processo de extração otimizado

4.3.1 Atividade antioxidante

Vários ensaios baseados em diferentes mecanismos são encontrados na literatura para a avaliação da capacidade antioxidante de alimentos e compostos químicos. Neste estudo, aplicaram-se dois métodos distintos: inibição da peroxidação lipídica (TBARS) e



inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA). O primeiro baseia-se na interação do malondialdeído (MDA; produto da peroxidação lipídica) com o ácido tiobarbitúrico (TBA), através da qual se formam as substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). Estas substâncias possuem uma coloração rosa, o que permite a sua determinação por espectrofotometria e, por conseguinte, a avaliação da capacidade antioxidante da amostra (Kaur & Geetha, 2006). Por sua vez, o OxHLIA é um ensaio celular que avalia a inibição da hemólise induzida por radicais livres em eritrócitos isolados a partir de sangue de ovelha por substâncias antioxidantes presentes na amostra (Takebayashi et al., 2012). Por envolverem material biológico, estes métodos geram resultados que refletem a atividade de eliminação de radicais biologicamente relevantes, tornando-se assim mais vantajosos que os ensaios químicos, que utilizam apenas radicais e alvos oxidáveis não naturais (Takebayashi et al., 2012).

Os resultados da atividade antioxidante obtidos para o extrato do epicarpo de frutos de *P. spinosa* são apresentados na **Tabela 9**. No ensaio de TBARS o valor de EC₅₀ obtido foi de 204 ± 2 µg/mL. Em outro estudo prévio (Barros et al., 2010), relatou-se um valor de EC₅₀ igual a 154 ± 2 µg/mL na análise do extrato metanólico de frutos inteiros de *P. spinosa*, para este mesmo ensaio antioxidante. Estes resultados estão suficientemente próximos para indicarem com veracidade o potencial antioxidante dos frutos de *P. spinosa*, sendo a pequena diferença entre eles justificada pela distinta quantidade e/ou perfil de compostos fenólicos presentes nos extratos analisados, resultante de fatores como: solvente utilizado, condições de extração, uso do fruto inteiro ou de certas partes do fruto e ano de colheita da amostra.

Relativamente ao método OxHLIA, as concentrações de extrato capazes de retardar a hemólise em 50% foram de 296 ± 4 e 509 ± 3 µg/mL, no que respeita aos 60 (EC₅₀ (60 min)) e 120 min (EC₅₀ (120 min)) de reação, respetivamente. Não foram encontrados dados bibliográficos que permitam uma comparação dos resultados obtidos neste ensaio, no entanto, outras matrizes como frutos de *Dracaena draco* L. (Silva et al., 2011) e de *Cydonia oblonga* Mille (Magalhães et al., 2009) também foram avaliadas pelo ensaio de inibição da hemólise oxidativa. Nestes estudos, os frutos inteiros de *D. draco* apresentaram um valor de EC₅₀ de 2,56 ± 0,97 µg/mL, enquanto a polpa e a casca de *C. oblonga* revelaram EC₅₀ de 652 µg/ml e 695 µg/ml, respetivamente, calculados após 3 h de incubação, utilizando eritrócitos humanos. Dadas as referidas diferenças na execução e interpretação de resultados do ensaio, não foi possível estabelecer uma comparação direta de valores de EC₅₀ com os obtidos no presente trabalho.



Tabela 9: Atividade antioxidante do extrato do epicarpo do fruto de *P. spinosa* (média \pm desvio padrão).

	OxHLIA		TBARS
	EC ₅₀ (60 min), $\mu\text{g/mL}$	EC ₅₀ (120 min), $\mu\text{g/mL}$	EC ₅₀ , $\mu\text{g/mL}$
Trolox	21,9 \pm 0,7	43,8 \pm 0,8	22,0 \pm 0,7
Extrato	296 \pm 4	509 \pm 3	204 \pm 2

O método de análise antioxidante aplicado é um fator que causa grande influência nos resultados obtidos, devido aos diferentes mecanismos em que se baseiam. Não obstante, através de diferentes ensaios antioxidantes, outros estudos também relatam a capacidade antioxidante apresentada por extratos de frutos de *P. spinosa*. Por exemplo, Ruiz-Rodríguez et al. (2014) analisaram a atividade antioxidante de cinco amostras diferentes de frutos de *P. spinosa* e de *Crataegus monogyna*, através dos métodos FRAP, ABTS e DPPH. O extrato de frutos de *P. spinosa* foi o que apresentou a maior capacidade antioxidante nos dois primeiros métodos, com resultados variando entre 1.83 \pm 0.15 e 7,64 \pm 0,74 mmol eq. trolox por 100 g de massa fresca para o método de ABTS e entre 7,11 \pm 0,38 a 15,17 \pm 0,21 mmol eq. trolox por 100 g de massa fresca para o método FRAP. Em outro estudo, Sikora, Bieniek, & Barbara (2013) avaliaram a atividade antioxidante de frutos de *P. spinosa* frescos e após armazenamento, através do método de ABTS, que apresentaram valores de 43,6 \pm 0,9 μmol eq. trolox por g de massa fresca no caso dos frutos frescos e de 48,5 \pm 3.35 μmol de trolox por g de massa fresca nos frutos congelados. Apesar de não serem diretamente comparáveis, estes e os métodos presentes neste estudo complementam-se, reforçando os resultados obtidos.

4.3.2 Atividade anti-inflamatória e citotóxica

A avaliação da atividade anti-inflamatória foi realizada em células macrófagas de rato RAW 264.7. Neste ensaio tem-se como resposta a concentração de extrato que provoca 50% de inibição da produção de NO (EC₅₀, $\mu\text{g/mL}$), gás reativo de radical livre que, entre outras substâncias, é libertado no decorrer de processos inflamatórios com a finalidade de combater microrganismos e endotoxinas, mas que quando em excesso pode causar danos aos tecidos (Besson-Bard, Pugin, & Wendehenne, 2008; Liu, Kao, Shiau, & Chen, 2018). O extrato de epicarpo de frutos de *P. spinosa* estudado não apresentou capacidade de inibição da produção de NO, não apresentando, assim, atividade anti-inflamatória nas concentrações testadas (400 a 1,56 $\mu\text{g/mL}$). Até onde temos



conhecimento, este é o primeiro estudo de atividade anti-inflamatória realizado em frutos de *P. spinosa*.

A capacidade citotóxica do extrato foi testada em quatro linhas de células tumorais humanas e em células não tumorais (carcinomas cervical, hepatocelular, de mama e pulmonar e numa cultura primária de células preparadas a partir de fígado de porco, respetivamente). No que respeita às linhas celulares tumorais, não foi observado o efeito de inibição do crescimento celular nas concentrações do extrato testado (400 a 6,25 $\mu\text{g/mL}$). Relativamente à citotoxicidade do extrato em células não tumorais, os resultados obtidos foram similares, o que revela a não toxicidade do mesmo em células hepáticas, mesmo na concentração mais elevada (400 $\mu\text{g/mL}$). Em estudos prévios, Guimarães et al. (2014) compararam a bioatividade de extratos fenólicos ricos em compostos não-antociânicos e extratos ricos em compostos antociânicos de frutos silvestres de *Arbutus unedo* L., *P. spinosa*, *Rosa micrantha* Borrer ex Sm e *Rosa canina* L. Nas análises de citotoxicidade, testadas nas linhas celulares MCF-7, NCI-H460, HeLa, HepG2, PLP2 e HCT-15 (carcinoma de cólon), os extratos antociânicos apresentaram menor atividade citotóxica que os não-antociânicos, com exceção do extrato de *R. micrantha* em células HepG2, o que levou a concluir que a bioatividade destes frutos está relacionada com o perfil de compostos fenólicos. Estes factos poderiam explicar a ausência de citotoxicidade revelada pelo extrato de epicarpo de frutos de *P. spinosa* avaliado neste estudo, uma vez que este é composto maioritariamente por antocianinas.

4.3.3 Atividade antimicrobiana

Os resultados da atividade antimicrobiana dos extratos de epicarpo de *P. spinosa* encontram-se na **Tabela 10**. As amostras foram testadas contra um conjunto de 9 estirpes de bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA)) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*) com importância na área da saúde.

O extrato estudado não apresentou ação bactericida nas concentrações testadas (20 a 0,156 mg/mL), contudo, o crescimento de todas as bactérias foi de alguma forma inibido, tornando possível obter valores de MIC (concentração mínima inibitória). Uma vez que os resultados obtidos foram heterogéneos, obtendo-se um amplo espectro de



atividade, não se verificou maior sensibilidade ou resistência ao efeito antimicrobiano da amostra por parte de nenhum grupo específico de bactérias. O melhor valor de MIC, ou seja, a menor concentração necessária para inibir o crescimento dos microrganismos estudados foi de 2,5 mg/mL para a bactéria Gram-positiva MSSA, seguida de 5 mg/mL para a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*. Em comparação com estudos desenvolvidos com outros frutos ricos em antocianinas, Pertuzatti et al. (2016) avaliaram a atividade antimicrobiana de dez cultivares de mirtilo e verificaram valores de MIC (20 mg/mL) superiores aos obtidos no presente estudo para o extrato de epicarpo de frutos de *P. spinosa*. Por sua vez, outros autores estudaram a atividade de extratos etanólicos do fruto inteiro (*P. spinosa*), por difusão em disco, utilizando cinco bactérias (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Salmonella abony* NCTC 6017) e dois fungos (*Aspergillus niger* ATCC 16404 e *Candida albicans* ATCC 10231) e foi verificada ação antimicrobiana em todos os microrganismos estudados, exceto em *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Aspergillus niger* ATCC 16404S (Velickovic et al., 2014).

Tabela 10: Atividade antimicrobiana do extrato do epicarpo de frutos de *P. spinosa* e controles positivos contra isolados clínicos selecionados (valores em mg/mL).

Bactérias	<i>P. spinosa</i>		Ampicillin		Imipenem		Vancomycin	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Gram-negativas								
<i>Escherichia coli</i>	5	>20	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	nt	nt
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	>20	10	20	<0,0078	<0,0078	nt	nt
<i>Morganella morganii</i>	10	>20	20	>20	<0,0078	<0,0078	nt	nt
<i>Proteus Mirabilis</i>	20	>20	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	nt	nt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	>20	>20	>20	0,5	1	nt	nt
Gram-positivas								
<i>Enterococcus faecalis</i>	20	>20	<0,15	<0,15	nt	nt	<0,0078	<0,0078
<i>Listeria monocytogenes</i>	20	>20	<0,15	<0,15	nt	nt	nt	nt
MRSA	10	>20	<0,15	<0,15	nt	nt	<0,0078	<0,0078
MSSA	2,5	>20	<0,15	<0,15	nt	nt	0,25	0,5

Legenda: MIC – Concentração inibitória mínima; MBC – Concentração bactericida mínima; MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina. nt – não testado



4.4 Estudo da incorporação do extrato corante à base de antocianinas do epicarpo de frutos de *Prunus spinosa* L. num produto de confeitaria.

4.4.1 Aspectos gerais

A confeitaria é a especialidade da culinária que envolve os alimentos doces, como bolos, tortas, chocolates, entre outros. No geral esse tipos de produtos são muito coloridos e atrativos, nos quais é comum a utilização de corantes alimentícios. O “beijinho” é um produto de confeitaria tipicamente brasileiro, que possui como ingredientes básicos leite condensado, nata e manteiga. Sendo uma variação do brigadeiro, o qual leva chocolate na preparação, o “beijinho” comumente é adicionado coco ralado ou corantes alimentares ou açúcares coloridos.

O extrato corante obtido do epicarpo de frutos de *P. spinosa* foi incorporado na formulação do doce “beijinho” para a análise da sua aplicabilidade e avaliação dos seus efeitos no produto, no dia de preparação e após um dia de armazenamento.

4.4.2 Caracterização das diferentes formulações de “beijinhos”

Nesta etapa do trabalho foram preparadas duas formulações de “beijinho” (**Figura 10**), sendo a primeira elaborada de acordo com a receita base e posteriormente avaliada em dois momentos diferentes: no dia de preparação (BB0) e 24 horas depois (BB1); a segunda formulação foi aditivada com o extrato do epicarpo de frutos de *P. spinosa* obtido (aproximadamente 0.23%) e avaliada nos mesmos momentos (dia de preparação: BA0 e após 24 horas: BA1).



Figura 10: Diferentes formulações de “beijinhos”. BA0 – “beijinhos” com a incorporação do extrato corante obtido do epicarpo de frutos de *P. spinosa*; BB0 – controlo, sem adição de corante.

Com o objetivo de comparar as duas formulações de “beijinhos”, caracterizou-se a sua composição nutricional, perfil em açúcares livres e em ácidos gordos, parâmetros de cor: L^* , a^* e b^* e também os parâmetros reológicos: dureza, adesividade, resiliência, coesão, elasticidade, gomosidade e mastigabilidade.

4.4.2.1 Parâmetros nutricionais

A **Tabela 11** mostra os valores médios, em g/100 g de produto fresco (pf), obtidos para a composição nutricional, açúcares livres e valor energético das formulações de “beijinhos” preparadas. Os hidratos de carbono foram a componente mais abundante (63,2 a 63,4 g/100 g pf), seguindo-se a gordura, presente em concentrações entre 16,2 a 16,4 g/100 g pf, o teor em água (9,9 a 10,0 g/100 g pf) e a proteína (9,0 a 9,1 g/100 g pf). A maior parte dos hidratos de carbono está presente sob a forma de açúcares livres (41,2 a 41,9 g/100 g pf), com destaque para a sacarose e a lactose. O valor energético correspondente está dentro da gama esperada para este tipo de produto 435 a 437 kcal/100 g pf).

Como seria de alguma forma expetável, não foram observadas alterações significativas na maior parte dos parâmetros nutricionais. A frutose, a glucose e os açúcares totais foram a exceção a esta tendência, tendo apresentado valores significativamente superiores nas amostras aditivadas com extrato do epicarpo de frutos de *P. spinosa* (BA0 e BA1), refletindo o perfil de açúcares livres deste fruto. De forma similar, verificou-se um ligeiro decréscimo da frutose e da glucose após armazenamento das amostras (BB1 e BA1).



Tabela 11: Composição nutricional, açúcares livres (g/100 g pf) e valor energético (kcal/100 g pf) das diferentes formulações de “beijinho”.

	Humidade	Gordura	Proteínas	Hidratos de carbono	Frutose	Glucose	Sacarose	Lactose	Açúcares totais	Cinzas	Energia
BB0	10,0±0,1	16,2±0,2	9,0±0,4	63,4±0,4	0,32±0,01 c	0,34±0,01 c	35,3±0,2	5,3±0,1	41,2±0,3 b	1,40±0,02	436±1
BB1	9,9±0,1	16,4±0,3	9,1±0,3	63,3±0,3	0,25±0,01 d	0,28±0,01 d	35,4±0,2	5,3±0,1	41,3±0,2 b	1,39±0,05	437±1
BA0	10,0±0,2	16,2±0,4	9,0±0,2	63,2±0,5	0,74±0,02 a	0,75±0,01 a	35,2±0,2	5,2±0,1	41,9±0,2 a	1,39±0,05	435±2
BA1	10,0±0,2	16,3±0,3	9,1±0,3	63,3±0,4	0,60±0,01 b	0,60±0,02 b	35,2±0,2	5,2±0,1	41,7±0,3 a	1,40±0,04	436±2
Homoscedasticidade ¹ (valor de <i>p</i>) (n = 36)	0,007	0,081	0,108	0,448	<0,001	<0,001	0,154	0,239	0,074	0,348	0,165
ANOVA ² (valor de <i>p</i>) (n = 36)	0,116	0,593	0,917	0,827	<0,001	<0,001	0,062	0,051	<0,001	0,743	0,059

¹Quando os valores de *p* forem inferiores a 0,05, a comparação múltipla foi feita pelo teste de Tamhane's T2, dado que as distribuições eram heteroscedásticas.

²Se o valor de *p* for inferior a 0,05, o parâmetro correspondente apresenta diferenças significativas para pelo menos uma das formulações (identificadas com letras diferentes).



4.4.2.2 Ácidos gordos

Para além dos ácidos gordos tabelados (**Tabela 12**) o perfil caracterizado nos “beijinhos” revelou ainda a presença de C11:0, C13:0, C15:1, C17:0, C17:1, C18:1n9t, C18:2n6t, C18:3n6, C18:3n3, C20:0, C20:1, C20:3n6, C20:4n6, C20:3n3 e C22:0, mas sempre em percentagens inferiores a 1%. Em relação aos ácidos gordos tabelados, a tendência geral foi semelhante à verificada entre os parâmetros nutricionais, dado que em nenhum dos casos foram detetadas diferenças significativas entre as formulações preparadas ou os tempos ensaiados.

Considerando a baixa percentagem que o extrato corante incorporado representa na globalidade da massa preparada, bem como o curto tempo de armazenamento, a similaridade entre as percentagens de todos os ácidos gordos quantificados está de acordo com o resultado que poderia ser esperado.

As formas mais abundantes foram ácido palmítico (C16:0, 34,9 a 35,2% dos ácidos gordos quantificados), ácido mirístico (C14:0, 13,2 a 13,4% dos ácidos gordos quantificados), ácido oleico (C18:1n9c, 10,2 a 10,5% dos ácidos gordos quantificados) e ácido esteárico (C18:0, 9,7 a 9,9% dos ácidos gordos quantificados).



Tabela 12: Composição em ácidos gordos (%) das diferentes formulações de beijinho (média±desvio-padrão).

	C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C14:1	C15:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1n9c	C18:2n6c	C22:2	AGS	AGMI	AGPI
BB0	4,3±0,1	2,5±0,1	1,7±0,1	3,6±0,1	5,4±0,1	13,3±0,2	1,5±0,1	1,1±0,1	35,2±0,3	1,6±0,1	9,9±0,2	10,2±0,2	5,2±0,3	1,0±0,1	77,9±0,4	16,3±0,1	8,1±0,1
BB1	4,1±0,2	2,4±0,1	1,7±0,1	3,7±0,1	5,3±0,2	13,3±0,2	1,5±0,1	1,1±0,1	35,1±0,4	1,7±0,1	9,7±0,2	10,3±0,2	5,3±0,3	1,0±0,1	77,7±1	16,4±0,3	8,4±0,2
BA0	4,1±0,1	2,5±0,1	1,7±0,1	3,7±0,1	5,3±0,2	13,4±0,2	1,5±0,1	1,2±0,1	34,9±0,5	1,7±0,1	9,9±0,2	10,4±0,1	5,2±0,2	1,0±0,1	76±1	16,4±0,2	7,9±0,3
BA1	4,0±0,2	2,4±0,1	1,6±0,1	3,7±0,1	5,3±0,2	13,2±0,3	1,5±0,1	1,2±0,1	35,0±0,5	1,6±0,1	9,9±0,3	10,5±0,4	5,3±0,2	1,0±0,1	75±1	16,4±0,3	8,2±0,3
Homoscedasticidade ¹ (valor de <i>p</i>) (n = 36)	0,434	0,498	0,827	0,462	0,800	0,098	0,060	0,003	0,134	0,806	0,095	0,007	0,918	0,751	0,024	0,001	0,848
ANOVA ² (valor de <i>p</i>) (n = 36)	0,024	0,198	0,814	0,082	0,868	0,370	0,589	0,584	0,590	0,126	0,247	0,226	0,822	0,621	0,071	0,153	0,564

¹Valores de *p* inferiores a 0,05 indicam distribuições heteroscedásticas, enquanto valores de *p* superiores a 0,05 indicam distribuições homoscedásticas. ²Tendo o valor de *p* sido sempre superior a 0,05, não foram feitas comparações múltiplas em qualquer dos ácidos gordos.



4.4.2.3 Parâmetros de cor

Considerando a importância do aspeto exterior em qualquer formulação alimentar, os parâmetros de cor, nomeadamente L^* (luminosidade), a^* (intensidade da cor vermelha) e b^* (intensidade da cor amarela), foram também caracterizados (**Tabela 13**).

Em relação ao valor de L^* , verificou-se que as amostras controlo (BB0 e BB1) apresentaram maior intensidade de brilho, o qual foi mantido ao longo das primeiras 24 horas. Nas amostras aditivadas com extrato de figo (BA0 e BA1), por outro lado, verificou-se uma variação significativa entre o dia de preparação e o dia seguinte, para além de ambos os valores serem inferiores aos das amostras controlo. Já a intensidade da cor vermelha foi mais intensa precisamente entre estas amostras (BA0 e BA1), o que está de acordo com a tonalidade do extrato do epicarpo de frutos de *P. spinosa*. Quanto ao parâmetro b^* , foram as formulações controlo (BB0 e BB1) a apresentar os maiores valores, evidenciando assim a sua tonalidade mais próxima da gama do amarelo.

Em relação aos valores de pH, as amostras aditivadas com extrato do epicarpo de frutos de *P. spinosa* apresentaram valores ligeiramente mais baixos, mas, tal como as amostras controlo, sem variação entre os dois períodos ensaiados.

Tabela 13: Parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) e pH nas diferentes formulações de beijinho.

	L^*	a^*	b^*	pH
BB0	81±2 a	-4±1 c	30±3 a	5,0±0,1 a
BB1	80±1 a	-4±1 c	28±1 b	5,1±0,1 a
BA0	54±1 c	20±1 a	4±1 d	4,7±0,1 b
BA1	65±2 b	14±1 b	13±1 c	4,7±0,1 b
Homoscedasticidade ¹ (valor de p) (n = 36)	0,053	0,211	<0,001	0,003
ANOVA ² (valor de p) (n = 36)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

¹Valores de p inferiores a 0,05 indicam distribuições heteroscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tamhane's T2; valores de p superiores a 0,05 indicam distribuições homoscedásticas, sendo as comparações múltiplas feitas pelo teste de Tukey HSD.

²Os valores de p inferiores a 0,050 em todos os casos indicam diferenças significativas em pelo menos uma formulação (identificadas com letras diferentes) para todos os parâmetros.

4.4.2.4 Parâmetros reológicos

Tendo em atenção a pertinência dos parâmetros texturais para a aceitação dos produtos alimentares por parte dos consumidores, foram avaliados sete parâmetros



reológicos: dureza, adesividade, resiliência, coesão, elasticidade, gomosidade e mastigabilidade (**Tabela 14**).

No que diz respeito à dureza, que pode ser entendida como a força necessária para comprimir os alimentos, verificou-se um decréscimo significativo do seu valor nas amostras aditivadas com o extrato corante, em particular no dia de preparação (611 ± 22 g). Por outro lado, a adesividade, que pode ser definida como a capacidade de os alimentos aderirem aos dentes quando mastigados, não apresentou diferenças significativas para qualquer das formulações. A mesma falta de diferenças significativas foi também verificada para a resiliência, que representa em que medida uma amostra recupera (em termos de força e velocidade) de uma deformação induzida. Também no que respeita à coesão, ou seja o nível até ao qual um alimento pode ser deformado até à fratura, não houve diferenças assinaláveis, apesar da significância estatística que revelou valores ligeiramente superiores para BA0 e BA1. Já em relação à elasticidade (a velocidade a que um alimento recupera de uma deformação, depois de a força indutora ser removida, até à sua forma inicial), as formulações BA0 e BA1 mostraram valores bastante superiores.

A gomosidade, que resulta do produto da dureza pela coesão, apresentou valores bastante similares, à exceção daqueles que foram obtidos para BA0. Esta similaridade acabou por ser também refletida na mastigabilidade, já que esta grandeza resulta do produto da gomosidade pela elasticidade (o mesmo é dizer do produto dos três parâmetros primários dureza, coesão e elasticidade), embora os valores obtidos para os “beijinhos” aditivados com o extrato corante tenham sido significativamente superiores.



Tabela 14: Parâmetros reológicos nas diferentes formulações de “beijinho”.

	Parâmetros primários				Parâmetros secundários		
	Dureza (g)	Adesividade (g.s)	Coesão (g)	Elasticidade (%)	Resiliência (%)	Gomosidade	Mastigabilidade
BB0	1230±134 a	-622±88	0,16±0,01 c	28±3 c	2,4±0,1	206±22 a	62±7 b
BB1	1185±133 a	-599±109	0,16±0,01 c	28±2 c	2,4±0,1	209±20 a	58±11 b
BA0	611±22 c	-543±44	0,26±0,01 a	50±2 a	2,4±0,1	161±15 b	82±9 a
BA1	938±23 b	-636±46	0,21±0,01 b	45±1 b	2,4±0,1	196±4 a	88±3 a
Homoscedasticidade ¹ (valor de <i>p</i>) (n = 36)	<0,001	0,050	0,474	0,001	0,048	0,017	0,041
ANOVA ² (valor de <i>p</i>) (n = 36)	<0,001	0,072	<0,001	<0,001	0,247	<0,001	<0,001

¹Valores de *p* inferiores a 0,050 indicam distribuições heteroscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tamhane's T2; valores de *p* superiores a 0,050 indicam distribuições homoscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tukey HSD. ²Se o valor de *p* for inferior a 0,050, o parâmetro correspondente apresenta diferenças significativas para pelo menos uma das formulações (identificadas com letras diferentes).



5 Conclusões



Os corantes são uma das classes de aditivos mais importantes em termos de *marketing*, já que a sua presença em produtos alimentares influencia as percepções, escolhas e preferências do consumidor. A busca por corantes de fontes naturais tornou-se uma forte tendência no mercado atual, dadas as questões de segurança relacionadas com a utilização de corantes artificiais, a recente proibição de alguns destes e o aumento da consciencialização dos consumidores no que respeita a produtos naturais. Sendo os frutos de *P. spinosa* subexplorados comercialmente e uma relevante fonte de antocianinas, o presente estudo contribui para a valorização destes frutos silvestres para a obtenção de extratos ricos em antocianinas, que podem encontrar potencial aplicação como corantes naturais em diferentes campos industriais.

Nesse sentido, um método de extração otimizado foi obtido comparando dois sistemas de extração avançados e eficientes (HAE e UAE). A simplicidade do uso de métodos convencionais (HAE ou maceração) *versus* as vantagens de novas tecnologias não convencionais (microondas, ultrassons, prensagem a frio, altas pressões, etc.) para recuperar compostos de materiais vegetais e subprodutos, é uma prioridade de muitas indústrias (por exemplo, nas áreas alimentar, farmacêutica, cosmética e nutracêutica), quer por questões ambientais quer do ponto de vista económico. Hoje em dia, pode ser difícil encontrar uma linha de produção que não aplique avanços tecnológicos para aumentar o lucro, diminuindo os custos de energia e reduzindo as emissões de gases, que contribuem para o aumento do efeito de estufa, para atender às exigências legais. Neste contexto, o presente trabalho propõe um novo método rápido de extração de antocianinas a partir de epicarpós de frutos de *P. spinosa*.

A eficiência da UAE foi maior do que a obtida com a HAE. As principais antocianinas identificadas foram a cianidina 3-rutinósido e a peonidina 3-rutinósido, tendo sido estas quantificadas. Através da otimização do processo de extração, foi possível atingir pela UAE $18,17 \pm 1,82$ mg CT/g R, $11,76 \pm 0,82$ mg CT/g E dw e $68,60 \pm 2,06\%$ de rendimento, sendo os parâmetros ótimos de extração $5,00 \pm 0,15$ min, $400,00 \pm 32,00$ W e $47,98 \pm 2,88\%$ de etanol. Os modelos matemáticos utilizados (modelos RSM e dose-resposta) foram estatisticamente significativos e permitiram a otimização da extração de antocianinas. Para os efeitos *S/L*, inspecionados nas condições ótimas, as respostas para todos os critérios avaliados seguiram uma relação linear decrescente até 250 g/L. A validação estatística foi feita de acordo com os altos valores do coeficiente de determinação ajustado.



Para além de possuírem propriedades corantes, as antocianinas são descritas na literatura como sendo benéficas fisiologicamente, incluindo entre outros, efeitos contra doenças cardiovasculares, aterosclerose e cancro. Nos estudos de bioatividade realizados neste trabalho, o extrato otimizado de frutos de *P. spinosa* revelou atividade antioxidante e capacidade inibitória do crescimento microbiano, além de ausência de potencial hepatotóxico. Isso realça as vantagens no desenvolvimento e utilização de um corante natural obtido do epicarpo de frutos de *P. spinosa* como substituinte de corantes artificiais.

Tendo em conta que a confeitaria é um setor alimentar de grande representatividade na utilização de corantes, devido aos diversos produtos coloridos, o estudo de aplicação do extrato foi efetuado num produto típico brasileiro “beijinhos”, onde se comprovou o seu potencial corante. A adição do extrato corante não causou alterações no pH, no perfil de ácidos gordos e nos parâmetros nutricionais dos “beijinhos”, exceto no teor de açúcares livres, onde os teores de glucose e frutose foram maiores quando comparados com o controle, refletindo o perfil de açúcares livres deste fruto. Os parâmetros de cor evidenciaram a tonalidade roxo-avermelhado do extrato. Com relação aos parâmetros reológicos, a adição do extrato corante alterou significativamente a dureza, a coesão, a elasticidade, a gomosidade e a mastigabilidade dos “beijinhos”, em comparação ao controle. Em geral, o extrato otimizado incorporado revelou uma boa capacidade corante sem alterar as características nutricionais do produto alimentar.

A partir deste trabalho, futuros estudos podem tornar-se oportunos no sentido de promover ainda mais a otimização da extração, como por exemplo medir a viabilidade da adição de etapas de re-extração, ou avaliar a quantidade de antocianinas presentes no epicarpo dos frutos de acordo com diferentes condições de cultivo e períodos de colheita. Ou ainda, no sentido de aumentar a estabilidade destes extratos, por exemplo através da avaliação da influência de fatores como tempo de armazenamento, temperatura de exposição e pH do meio. Além disso, técnicas de encapsulação, como microencapsulação, lipossomas, ou nanoemulsões, que têm ganho grande interesse na comunidade académica, podem ser uma linha de investigação na estabilização e incorporação das antocianinas em diferentes matrizes alimentares.



REFERÊNCIAS

- Abreu, R. M. V., Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., Lima, R. T., Vasconcelos, M. H., Adegas, F., ... Queiroz, M. J. R. P. (2011). Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-b]pyridine-2-carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(12), 5800–5806.
- Agcam, E., Akyıldız, A., & Balasubramaniam, V. M. (2017). Optimization of anthocyanins extraction from black carrot pomace with thermosonication. *Food Chemistry*, 237, 461–470.
- Ajila, C. M., Naidu, K. A., Bhat, S. G., & Prasada Rao, U. J. S. (2007). Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chemistry*, 105(2016), 982–988.
- AOAC. (2016). Official methods of analysis of AOAC International, 20th edition. *Association of Official Analytical Chemists International; Arlington; USA*.
- Aun, M. V, Mafra, C., Philippi, J. C., Kalil, J., Agondi, R. C., & Motta, A. (2011). Aditivos em alimentos. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, 34(5), 177–186.
- Bailoni, M. A., Bobbio, P. A., & Bobbio, F. O. (1998). Preparação e estabilidade do extrato antociânico das folhas da *Acalypha hispida*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 18(1), 17–18.
- Barros, L., Carvalho, A. M., Morais, J. S., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*, 120(1), 247–254.
- Barros, L., Pereira, E., Calhelha, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1732–1740.



- Belitz, H.-D., & Grosch, W. (1997). *Food Chemistry* (Second edi). New York: Springer.
- Besson-Bard, A., Pugin, A., & Wendehenne, D. (2008). New Insights into Nitric Oxide Signaling in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 21–39.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, E. A., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965–977.
- Bosiljkov, T., Dujmić, F., Cvjetko Bubalo, M., Hribar, J., Vidrih, R., Brnčić, M., ... Jokić, S. (2017). Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food and Bioprocess Processing*, 102, 195–203.
- Bouras, M., Chadni, M., Barba, F. J., Grimi, N., Bals, O., & Vorobiev, E. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Quercus* bark. *Industrial Crops and Products*, 77, 590–601.
- Brasil. CNNPA - Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução - CNNPA nº 44 de 1977, D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 01 de fevereiro de 1978 § (1978).
- Brasil. (2017). ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Retrieved October 14, 2017, from <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2954708/Capítulos+do+Volume+1+-+13+Substâncias+corantes.pdf/30224e2c-f071-46c0-b415-7e3b0db90823>
- Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59(4), 379–389.
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives, 13 *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* § (2014). Blackwell Publishing Inc.
- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 284–295.



- Carvalho, A. M. (2005). *Etnobotánica del Parque Natural de Montesinho. Plantas, tradición y saber popular en un territorio del nordeste de Portugal*. Universidade Autónoma de Madrid.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *34*, 540–560.
- Chen, M. H., McClung, A. M., & Bergman, C. J. (2017). Phenolic content, anthocyanins and antiradical capacity of diverse purple bran rice genotypes as compared to other bran colors. *Journal of Cereal Science*, *77*, 110–119.
- CLSI. (2008). Document M100-S18. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA.
- Codex Alimentarius. (1995). Codex Stan 192-1995. General Standard for Food Additives. Retrieved October 11, 2017, from http://www.fao.org/gsfaonline/docs/CXS_192e.pdf
- Constant, P. B. L., Stringheta, P. C., & Sandi, D. (2002). Corantes alimentícios. *Boletim Do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, *20*(2), 203–220.
- Corrêa, R. C. G., de Souza, A. H. P., Calhelha, R. C., Barros, L., Glamoclija, J., Sokovic, M., ... Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactive formulations prepared from fruiting bodies and submerged culture mycelia of the Brazilian edible mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* Singer. *Food and Function*, *6*(7), 2155–2164.
- Corrêa, R. C. G., Haminiuk, C. W. I., Barros, L., Dias, M. I., Calhelha, R. C., Kato, C. G., ... Ferreira, I. C. F. . R. (2017). Stability and biological activity of Merlot (*Vitis vinifera*) grape pomace phytochemicals after simulated in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation. *Journal of Functional Foods*, *36*, 410–417.
- DeMan, J. M. (1999). *Principles of Food Chemistry* (Second Edi). New York: Chapman & Hall.



- Downham, A., & Collins, P. (2000). Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science and Technology*, 35(1), 5–22.
- Elisia, I., Hu, C., Popovich, D. G., & Kitts, D. D. (2006). Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract. *Food Chemistry*, 101(3), 1052–1058.
- Escudero-Gilete, M. L., & Romero, I. M. V. (2017). Colorantes alimentarios. In I. Mateos-Aparicio (Ed.), *Aditivos alimentarios* (108–142). Madri: Dextra Editorial.
- EUCAST. (2013). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST); European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Stockholm, Sweden.
- Evans, B. C., Nelson, C. E., Yu, S. S., Beavers, K. R., Kim, A. J., Li, H., ... Duvall, C. L. (2013). Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *Journal of Visualized Experiments*, (73), e50166.
- Fernandes, Â., Barreira, J. C. M., Barros, L., Mendonça, Á., Ferreira, I. C. F. R., & Ruivo de Sousa, F. (2018). Chemical and physicochemical changes in Serrana goat cheese submitted to extra-long ripening periods. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 33–39.
- Ganhão, R., Estévez, M., Kylli, P., Heinonen, M., & Morcuende, D. (2010). Characterization of selected wild mediterranean fruits and comparative efficacy as inhibitors of oxidative reactions in emulsified raw pork burger patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8854–8861.
- Garcia, C. E. R., Bolognesi, V. J., Dias, J. de F. G., Miguel, O. G., & Costa, C. K. (2012). Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. *Ciência Rural*, 42(8), 1510–1517.
- Guimarães, R., Barros, L., Calhelha, R. C., Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Bioactivity of different enriched phenolic extracts of wild fruits from northeastern Portugal: a comparative study. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69(1), 37–42.



- Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R. P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chemistry*, *141*(4), 3721–3730.
- Helena, S. A., Prieto, M. A., Barros, L., Rodrigues, A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Optimization of microwave-assisted extraction of ergosterol from *Agaricus bisporus* L. by-products using response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing*, *100*, 25–35.
- Hernández-Herrero, J. A., & Frutos, M. J. (2011). Degradation kinetics of pigment, colour and stability of the antioxidant capacity in juice model systems from six anthocyanin sources. *International Journal of Food Science and Technology*, *46*(12), 2550–2557.
- Houghton, J. D., & Hendry, G. A. F. (2012). Natural Food Colorants. *Saudi Med J*, 348.
- Ieri, F., Pinelli, P., & Romani, A. (2012). Simultaneous determination of anthocyanins, coumarins and phenolic acids in fruits, kernels and liqueur of *Prunus mahaleb* L. *Food Chemistry*, *135*(4), 2157–2162.
- Kaur, I., & Geetha, T. (2006). Screening Methods for Antioxidants-A Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, *6*(3), 305–312.
- Kuete, V., Ango, P. Y., Fotso, G. W., Kapche, G. D. W. F., Dzoyem, J. P., Wouking, A. G., ... Abegaz, B. M. (2011). Antimicrobial activities of the methanol extract and compounds from *Artocarpus communis* (Moraceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *11*(1), 42–46.
- Liu, H. L., Kao, T. H., Shiau, C. Y., & Chen, B. H. (2018). Functional components in *Scutellaria barbata* D. Don with anti-inflammatory activity on RAW 264.7 cells. *Journal of Food and Drug Analysis*, *26*(1), 31–40.
- Lopes, T. J., Xavier, M. F., Gabriela, M., Quadri, N., & Quadri, M. B. (2007). Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. *Revista Brasileira Agrociência*, *13*(3), 291–297.
- López, C. J., Caleja, C., Prieto, M. A., Barreiro, M. F., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Optimization and comparison of heat and ultrasound assisted extraction



- techniques to obtain anthocyanin compounds from *Arbutus unedo* L. Fruits. *Food Chemistry*, 264, 81–91.
- Magalhães, A. S., Silva, B. M., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Valentão, P., & Carvalho, M. (2009). Protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1372–1377.
- Maia, J. L. (2013). *Desenvolvimento de microcápsulas contendo as antocianinas presentes no corante do extrato do jambo por polimerização interfacial*. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science and Technology*, 52, 1–15.
- Mojica, L., Berhow, M., & Gonzalez de Mejia, E. (2017). Black bean anthocyanin-rich extracts as food colorants: Physicochemical stability and antidiabetes potential. *Food Chemistry*, 229, 628–639.
- Montesano, D., Fallarino, F., Cossignani, L., Bosi, A., Simonetti, M. S., Puccetti, P., & Damiani, P. (2008). Innovative extraction procedure for obtaining high pure lycopene from tomato. *European Food Research and Technology*, 226(3), 327–335.
- Morales, P., Ferreira, I. C. F. R., Carvalho, A. M., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M. S. O. S. C. C., Cámara, M., ... Tardío, J. (2013). Wild edible fruits as a potential source of phytochemicals with capacity to inhibit lipid peroxidation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(2), 176–185.
- Moreira, G. E. G. (2007). *Obtenção e caracterização de extrato microencapsulado de resíduo agroindustrial de acerola*. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- Moutinho, I. L. D., Bertges, L. C., & Assis, R. V. C. (2007). Prolonged use of the food dye tartrazine (FD&C yellow no5) and its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. *Brazilian Journal of Biology*, 67(1), 141–145.



- Murado García, M. A., & Prieto Lage, M. Á. (2013). Dose-Response Analysis in the Joint Action of Two Effectors. A New Approach to Simulation, Identification and Modelling of Some Basic Interactions. *PLoS ONE*, 8(4), e61391.
- Olivas-Aguirre, F. J., Rodrigo-García, J., Martínez-Ruiz, N. D. R., Cárdenas-Robles, A. I., Mendoza-Díaz, S. O., Álvarez-Parrilla, E., ... Wall-Medrano, A. (2016). Cyanidin-3-O-glucoside: Physical-chemistry, foodomics and health effects. *Molecules*, 21, 1264–1294.
- Oludemi, T., Barros, L., Prieto, M. A., Heleno, S. A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Extraction of triterpenoids and phenolic compounds from *Ganoderma lucidum*: Optimization study using the response surface methodology. *Food and Function*, 9(1), 209–226.
- Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., Rebello, L. P. G., Gómez-Alonso, S., Duarte, R. M. T., Duarte, M. C. T., ... Hermosín-Gutiérrez, I. (2016). Antimicrobial activity and differentiation of anthocyanin profiles of rabbiteye and highbush blueberries using HPLC–DAD–ESI–MS and multivariate analysis. *Journal of Functional Foods*, 26, 506–516.
- Pinacho, R., Cavero, R. Y., Astiasarán, I., Ansorena, D., & Calvo, M. I. (2015). Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of in vitro digestion on their antioxidant capacity. *Journal of Functional Foods*, 19, 49–62.
- Piñeiro, Z., Palma, M., & Barroso, C. G. (2004). Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids. *Journal of Chromatography A*, 1026, 19–23.
- Pinela, J., Prieto, M. A., Carvalho, A. M., Barreiro, M. F., Oliveira, M. B. P. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Microwave-assisted extraction of phenolic acids and flavonoids and production of antioxidant ingredients from tomato: A nutraceutical-oriented optimization study. *Separation and Purification Technology*, 164, 114–124.
- Prado, M. A., & Godoy, H. T. (2003). Corantes artificiais em alimentos. *Alimentos E Nutrição Araraquara*, 14(2), 237–250.
- Prieto, M. A., & Vázquez, J. A. (2014). In vitro determination of the lipophilic and



- hydrophilic antioxidant capacity of unroasted coffee bean extracts and their synergistic and antagonistic effects. *Food Research International*, 62(10), 1183–1196.
- Regulamento (CE) n° 1333/2008. Regulamento (CE) n° 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de Dezembro de 2008, sobre aditivos alimentares, Jornal Oficial da União Europeia § (2008).
- Regulamento (UE) n° 1129/2011. Regulamento (UE) n° 1129/2011 da Comissão, de 11 de novembro de 2011, que altera o anexo II do Regulamento (CE) n° 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares, Jornal Oficial da União Europeia § (2011).
- Roriz, C. L., Barros, L., Prieto, M. A., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Modern extraction techniques optimized to extract betacyanins from *Gomphrena globosa* L. *Industrial Crops and Products*, 105(April), 29–40.
- Roriz, C. L., Barros, L., Prieto, M. A., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Floral parts of *Gomphrena globosa* L. as a novel alternative source of betacyanins: Optimization of the extraction using response surface methodology. *Food Chemistry*, 229, 223–234.
- Ruiz-Rodríguez, M. B., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Fernández-Ruiz, V., de Cortes Sánchez-Mata, M., Cámara, M., & Tardío, J. (2014). Wild blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) fruits as valuable sources of antioxidants. *Fruits*, 69(1), 61–73.
- Sampaio, P. G. (2009). *Otimização da extração, esterilização e identificação de antocianinas obtidas a partir de frutas*. Unicamp.
- Schons, J. I., Fiori, K. P., Ribeiro, E. B., Andrighetti, C. R., Nogueira, R., & De Sousa Valladão, D. M. (2017). Extração assistida por ultrassom e caracterização do óleo da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). *Interciencia*, 42(9), 586–590.
- Shiozer, A. L., & Barata, L. E. S. (2007). Estabilidade de Corantes e Pigmentos de Origem Vegetal. *Revista Fitos*, 3, 6–24.



- Sikora, E., Bieniek, M. I., & Barbara, B. (2013). Composition and antioxidant properties of fresh and frozen stored blackthorn fruits (*Prunus spinosa* L.). *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 12(4), 365–372.
- Silva, B. M., Santos, R. P., Mendes, L. S., de Pinho, P. G., Valentão, P., Andrade, P. B., ... Carvalho, M. (2011). *Dracaena draco* L. fruit: Phytochemical and antioxidant activity assessment. *Food Research International*, 44(7), 2182–2189.
- Souza, R. M. De. (2012). *Corantes naturais alimentícios e seus benefícios à saúde*. UEZO - Centro Universitário Estadual da Zona Oeste.
- Takebayashi, J., Iwahashi, N., Ishimi, Y., & Tai, A. (2012). Development of a simple 96-well plate method for evaluation of antioxidant activity based on the oxidative haemolysis inhibition assay (OxHLIA). *Food Chemistry*, 134(1), 606–610.
- Tomšik, A., Pavlič, B., Vladić, J., Ramić, M., Brindza, J., & Vidović, S. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 502–511.
- Usenik, V., Fabčič, J., & Štampar, F. (2008). Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry*, 107(1), 185–192.
- Velickovic, J., Kostic, D., Stojanovic, G., Mitic, S., Mitic, M., Randjelovic, S., & Djordjevic, A. (2014). Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit. *Hemijska Industrija*, 68(3), 297–303.
- Vieira, V., Prieto, M. A., Barros, L., Coutinho, J. A. P., Ferreira, O., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Optimization and comparison of maceration and microwave extraction systems for the production of phenolic compounds from *Juglans regia* L. for the valorization of walnut leaves. *Industrial Crops and Products*, 107, 341–352.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 161–169.
- Vuong, Q. V., Golding, J. B., Nguyen, M., & Roach, P. D. (2010). Extraction and



isolation of catechins from tea. *Journal of Separation Science*, 33, 3415–3428.

Wang, W., Jung, J., Tomasino, E., & Zhao, Y. (2016). Optimization of solvent and ultrasound-assisted extraction for different anthocyanin rich fruit and their effects on anthocyanin compositions. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 229–238.

Wong, D. W. S. (1995). *Química de los alimentos: mecanismos y teoría*. Saragoça: Acribia, S.a.

Yamazaki, H., Akieda, S., Tanaka, Y., Yokoi, T., & Yamaguchi, T. (1997). Effect of food additives (natural red colors) on rabbit platelet functions. *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health*, 43(1), 6–6.

Yamazaki, H., Ito, M., Fujiwara, M., Yamaguchi, T., Yamauchi, A., & Kakiuchi, Y. (1994). Effect of food additives on rabbit platelet functions (II). *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health*, 40(1), 41–41.

Zhu, Z., He, J., Liu, G., Barba, F. J., Koubaa, M., Ding, L., ... Vorobiev, E. (2016). Recent insights for the green recovery of inulin from plant food materials using non-conventional extraction technologies: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, 1–9.