

**Utilização do fruto de *Solanum melongena* L. como fonte de nutrientes,  
compostos bioativos e corantes**

**Gabriel Figueiredo Pantuzza Silva**

Dissertação apresentada à  
**Escola Superior de Tecnologia e Gestão**  
**Instituto Politécnico de Bragança**

Para obter o grau de mestre em  
**Engenharia Química**

Orientadores  
**Doutora Lillian Barros**  
**Doutora Eliana Pereira**



*“Somos feitos da mesma matéria que nossos sonhos.”*

William Shakespeare

Este trabalho é financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Regional Norte 2020, no âmbito do Projeto Norte-01-0247-FEDER-024479 (projeto *Mobilizador* ValorNatural), e pelo programa FEDER-Interreg Espanha-Portugal, no âmbito dos projetos 0377\_Iberphenol\_6\_E e TRANSCoLAB 0612\_TRANS\_CO\_LAB\_2\_P



## Agradecimentos

A gratidão é uma virtude e por mais que até possamos ir mais rápido sozinhos, sempre chegamos mais longe e melhor com a ajuda dos outros.

Primeiramente gostava de agradecer à **Professora Doutora Isabel Ferreira** pela oportunidade e confiança em deixar-me fazer parte deste grupo de excelência, também por toda orientação e correções.

À **Doutora Lillian Barros**, por toda simpatia, conhecimento e orientações que me foram transmitidos durante todo este trabalho, e por poder participar de sua equipa e laboratórios.

À **Doutora Eliana Pereira**, palavras são pouco perto do que precisava para agradecer tamanha dedicação, paciência e cuidados que teve para mim e este trabalho. Aprendi muito consigo, que me ensinou como caminhar sozinho nesta estrada chamada investigação. Meu imenso obrigado.

Um agradecimento especial ao **Doutor Jose Luiz Díaz de Tuesta Triviño**, que teve um papel decisivo em mostrar-me um caminho para a carreira de investigador o qual eu estava a me afastar na altura. Sua sensibilidade ao me enviar aquele email motivacional mudaram o rumo de minha história, espero que de alguma forma sejas recompensado pelo bem que fez à minha vida. Por isso, e por tudo que seguiu, meu imenso obrigado.

Quero também agradecer à professora **Doutora Maria Olga de Amorim e Sá Ferreira** e ao **Professor Doutor Simão Pedro de Almeida Pinho** por terem me ajudado sem medidas e terem me ensinado que o relacionamento humano dentro do ambiente de trabalho é de veras importante e gratificante. Com muito carinho meu imenso obrigado.

À toda equipa da **BioChemCore** por terem me recebido tão bem e por terem me suportado durante todas análises e experimentos, mas também com uma amizade e coleguismo que me fizeram sentir muito à vontade e feliz ao trabalhar neste sítio. Um agradecimento especial a **Bruno Melgar**, por toda a ajuda.

À toda equipa e infraestrutura do **CIMO** e **ESTiG** e **IPB**, que me proporcionaram a realização deste trabalho, várias amizades e uma oportunidade única de crescimento profissional

e pessoal. Quanto a isso não tenho dúvidas que me lembrarei para sempre de todos estes momentos únicos.

Aos **meus pais** por desde sempre terem sido exemplos de ética, estudo, trabalho, dedicação, amor e disciplina. Isto tudo vem de vocês, e para vocês quero que guardem isto como um presente que é pouco perto do que eu gostaria de vos dar.

À minha **tia Kátia**, que poliu um homem e ensinou a importância e o poder dos detalhes em transformar nossa realidade. Para você guardei o mais especial que posso dar no que diz respeito a gratidão. Muito obrigado, querida.

Aos **meus avós**, pois cada um deles em sua maneira única de amor incondicional e exemplos me moldaram com ética, responsabilidade e acima de tudo, felicidade. A vocês dedico a melhor flor em tudo que brotar de bom em minha vida.

Aos **meus sogros** por terem criado e educado minha esposa da forma que ela é, e por todo apoio que tem dado para nós dois e nossos objetivos. Para vocês prometo ser o melhor marido e genro que um dia imaginaram.

Por último, e para encerrar, quero agradecer a minha esposa, companheira, amiga e maior fonte de orgulho e inspiração que tenho em minha vida. **Juliana Leal Henriques**, dedico a você não somente este trabalho, mas todo e qualquer resultado e conquista que eu tenha nesta caminhada, saiba que minha maior motivação é construir junto a você uma vida repleta de felicidade e amor. Este trabalho assim como todos os outros feitos que tenho conquistado nos últimos anos não seriam possíveis sem você. Para você reservo todo meu amor e dedicação para tornar sua vida feliz como você faz para mim. Amo-te ao infinito e além.

## Abreviaturas

<i>a</i> *	Cromaticidade vermelho/verde
a.C.	Antes de Cristo
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico
AOAC	Metodologias Oficiais de Análises de Alimentos
ATCC	Coleção de cultura de tipo americano
<i>b</i> *	Cromaticidade azul/amarelo
BHT	Hidroxitolueno butilado
CIE	"Comissão Internacional de Iluminação"
CMB	Concentração mínima bactericida
CMF	Concentração mínima fungicida
CMI	Concentração mínima inibitória
DAD	Detetor de díodos
DCCC	Desenho composto central circunscrito
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EAG	Equivalente de ácido gálico
EC <sub>50</sub>	Concentração de extrato correspondente a 50% da atividade antioxidante
ECACC	"Coleção Europeia de Cultura de Células Animais"
EFSA	Agência Europeia de Normas Alimentares
Eq.	Equação
ESI	Fonte de ionização electrospray
FAME	Esteres metílicos de ácidos gordos
FAO	Organização para Alimentação e Agricultura
FID	Detetor de ionização de chama
GC	Cromatografia gasosa
GC-FID	Cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama
GI <sub>50</sub>	Concentração para 50% da inibição máxima da proliferação celular
GLC	Cromatografia gasosa fase estacionaria líquida

GSC	Cromatografia gasosa fase estacionaria solida
HAE	Extração assistida por calor
HBSS	Solução salina de Hank's
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HepG2	Carcinoma hepatocelular
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IAM 5061	Trichoderma viride
INT	<i>p</i> -cloreto de iodonitrotetrazólio
IQF	Congelado individualmente rapidamente
IR	Infravermelho
<i>L</i> *	Luminosidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LLC	Cromatografia líquida fase estacionaria líquida
LPS	Lipopolissacarídeos
LSC	Cromatografia líquida fase estacionaria solida
LTQ XL	Espectrómetro de massa Linear Ion Trap
<i>m/v</i>	Razão massa/volume
MA	Malte ágar
MCF-7	Carcinoma da mama
MDA	Malodialdeído
mf	Massa fresca
MHB	Agar Mueller-Hinton
MS	Espectrometria de massa
ms	Massa seca
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados
<i>n</i>	Número de variáveis
NCTC	Coleção nacional de culturas-tipo
NED	Etilenodiamina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PE	Porcentagem da população de eritrócitos
pH	Potencial hidrogeniônico

PI	Padrão interno
PLP2	Proteína proteolípídica 2 (cultura primária de células de fígado de porco)
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
R, R'	Radical orgânico genérico
RI	Índice de refração
RSM	Metodologia de superfície de resposta
RWD	Secagem por janela de refração
S/L	Razão sólido/líquido
SFA	Ácidos gordos saturados
SFB	Sérum fetal de bovino
SRB	Sulforodamina B
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TFA/ATF	Ácido trifluoroacético
TSB	Caldo de soja trípico
UFLC	Cromatógrafo Líquido Ultra-rápido
UFLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de díodos
UPLC	Cromatografia líquida de ultra-eficiência
UV	Radiação ultravioleta
UV-VIS	Radiação ultravioleta-visível
v/v	Volume/volume
X	Variável independente
Y	Variável dependente
$\lambda_{\max}$	Comprimento de onda de absorção máxima

## Índice

Agradecimentos .....	v
Abreviaturas.....	vii
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Tabelas .....	xiv
Índice de Equações.....	xv
Resumo .....	xvi
Abstract .....	xviii
1. Introdução.....	1
1.1. Caracterização do fruto de <i>Solanum melongena</i> L.....	1
1.1.1. Etimologia e aplicações .....	1
1.1.2. Composição química, nutricional e propriedades bioativas .....	4
1.2. Antocianinas: caracterização e aplicações na indústria alimentar.....	8
1.2.1. Características químicas e propriedades bioativas .....	8
1.2.2. Técnicas de extração e estabilização .....	12
1.2.3. Aplicações na indústria alimentar .....	15
2. Objetivos.....	17
3. Material e métodos .....	18
3.1. Preparação da amostra .....	18
3.2. Padrões e reagentes.....	18
3.2.1. Análise química .....	18
3.2.2. Estudo das bioatividades.....	19
3.3. Avaliação da cor do epicarpo dos frutos de <i>Solanum melongena</i> L.....	19
3.4. Determinação do valor nutricional dos frutos de <i>Solanum melongena</i> L.: polpa e fruto inteiro .....	20

3.5. Determinação da composição química dos frutos de <i>Solanum melongena</i> L.: polpa e fruto inteiro.....	21
3.5.1. Açúcares.....	21
3.5.2. Ácidos orgânicos .....	22
3.5.3. Tocoferóis.....	23
3.5.4. Ácidos gordos.....	24
3.5.5. Compostos fenólicos.....	25
3.5.5.1. Compostos fenólicos não antociânicos .....	25
3.5.5.2. Compostos fenólicos antociânicos.....	26
3.6. Avaliação das propriedades bioativas dos frutos de <i>Solanum melongena</i> L.: epicarpo, polpa e fruto inteiro, através de ensaios <i>in vitro</i> .....	28
3.6.1. Análise da atividade antimicrobiana.....	28
3.6.1.1. Atividade antibacteriana.....	28
3.6.1.2. Atividade antifúngica.....	29
3.6.2. Avaliação da citotoxicidade em linhas celulares tumorais .....	30
3.6.3. Avaliação da hepatotoxicidade numa cultura celular primária não tumoral....	32
3.6.4. Avaliação da atividade anti-inflamatória .....	32
3.6.5. Avaliação da atividade antioxidante .....	33
3.6.5.1. TBARS.....	33
3.6.5.2. OxHLIA .....	35
3.7. Otimização do processo de extração para obtenção de um corante natural à base de antocianinas, a partir do epicarpo dos frutos de <i>Solanum melongena</i> L. ....	36
3.7.1. Desenho experimental e procedimento de extração assistida por ultrassons	37
3.7.2. Preparação dos extratos obtidos pela extração assistida por ultrassons.....	39
3.7.3. Identificação e quantificação dos compostos antociânicos por HPLC-DAD	39
3.7.4. Formato de resposta utilizada para processos analíticos.....	40

3.7.5.	Análise do modelo matemático e avaliação estatística.....	40
3.7.5.1.	Modelo matemático .....	40
3.7.5.2.	Procedimento para otimização das variáveis.....	40
3.7.5.3.	Métodos numéricos, análise estatística e ilustrações gráficas.....	41
3.8.	Preparação do extrato ótimo rico em antocianinas a partir do epicarpo do fruto de <i>Solanum melongena</i> L. ....	41
3.9.	Análise estatística .....	42
4.	Resultados e Discussão.....	43
4.1.	Avaliação da cor do epicarpo, polpa e fruto inteiro de <i>S. melongena</i> .....	43
4.2.	Caracterização nutricional do fruto da beringela (inteiro e polpa).....	45
4.3.	Composição química do fruto da <i>Solanum melongena</i> L. ....	47
4.3.1.	Perfil em açúcares, ácidos orgânicos, tocoferóis e ácidos gordos.....	47
4.3.2.	Perfil em compostos fenólicos não antociânicos e antociânicos.....	52
4.4.	Atividade antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, hepatotóxica e anti-inflamatória do extrato hidroetanólico obtido a partir do epicarpo de <i>S. melongena</i> pelo método convencional .....	58
4.5.	Otimização do processo de obtenção de um extrato corante à base de antocianinas a partir do epicarpo de <i>S. melonera</i> .....	62
4.5.1.	Efeito da concentração de solvente .....	62
4.5.2.	O efeito da razão sólido-líquido.....	64
4.5.3.	O efeito do tempo de extração .....	65
4.5.4.	Análise estatística e ajuste do modelo .....	66
4.5.5.	Otimização da análise da metodologia de superfície de resposta .....	68
5.	Considerações finais e perspectivas futuras .....	69
	Bibliografia.....	72

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Figura representativa da produção mundial de beringela em 2017 .....	2
<b>Figura 2.</b> Gráfico referente à área de colheita (em hectares) e produção de beringela (em toneladas) a nível mundial, entre os anos de 1994 e 2017 .....	2
<b>Figura 3.</b> Imagem representativa de legumes e frutos com antocianina na sua composição .....	9
<b>Figura 4.</b> Imagem representativa da escala de cores do extrato de amora em valores de pH variando de 1 a 14. ....	10
<b>Figura 5.</b> Estrutura química de uma antocianidina genérica .....	10
<b>Figura 6.</b> Coordenadas tridimensionais CIE $L^* a^* b^*$ .....	20
<b>Figura 7.</b> Ensaio de avaliação citotóxica em linhas celulares tumorais .....	31
<b>Figura 8.</b> Ensaio de avaliação da atividade inflamatória.....	33
<b>Figura 9.</b> Formação do complexo MDA-TBA. ....	34
<b>Figura 10.</b> Ensaio de avaliação da atividade antioxidante .....	34
<b>Figura 11.</b> Ensaio experimental OxHLIA .....	36
<b>Figura 12.</b> Procedimento experimental da extração assistida por ultrassom.....	39
<b>Figura 13.</b> Perfil de compostos fenólicos não antociânicos (A) e antociânicos (B) dos extratos hidroetanólicos do fruto de <i>S. melongena</i> (fruto inteiro e epicarpo, respetivamente) registados a 280 nm (i) e 520 nm (ii). ....	57
<b>Figura 14.</b> Representação gráfica de RSM para a resposta $Y_1$ (mg/g de massa seca).....	63
<b>Figura 15.</b> Representação gráfica de RSM para a resposta $Y_2$ (mg/g de extracto).....	65
<b>Figura 16.</b> Representação gráfica de RSM para a resposta $Y_3$ (rendimento). ....	66

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Valor nutricional da berinjela (massa fresca).....	4
<b>Tabela 2.</b> Compostos bioativos presentes na composição de berinjela e suas aplicações e benefícios para saúde.....	5
<b>Tabela 3.</b> Substituintes R e R' para antocianidinas naturais.....	10
<b>Tabela 4.</b> Cianidina e seus derivados. ....	11
<b>Tabela 5.</b> Delineamento experimental e codificação das variáveis independentes usadas no desenho fatorial DCC com 5 níveis.....	38
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros físicos (cor - CIE $L^* a^* b^*$ ) do epicarpo do fruto de <i>Solanum melongena</i> L. fresco e liofilizado .....	43
<b>Tabela 7.</b> Parâmetros nutricionais do fruto de <i>Solanum melongena</i> L.....	45
<b>Tabela 8.</b> Composição em açúcares do fruto de <i>Solanum melongena</i> L.....	49
<b>Tabela 9.</b> Composição em ácidos gordos do fruto de <i>Solanum melongena</i> L.....	51
<b>Tabela 10.</b> Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima na região de UV-Vis ( $\lambda_{max}$ ), tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos no extrato hidroetanólico da polpa, epicarpo e do fruto inteiro de <i>Solanum melongena</i> L....	56
<b>Tabela 11.</b> Atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos do fruto, polpa e epicarpo de <i>S. melongena</i> . ....	59
<b>Tabela 12.</b> Atividade antibacteriana (MIC e MBC mg/mL) e antifúngica (MIC e MFC mg/mL) dos extratos de berinjela (fruto inteiro, casca e polpa). ....	60
<b>Tabela 13.</b> Atividade citotóxica dos extratos de berinjela (fruto inteiro, casca e polpa).62	
<b>Tabela 14.</b> Projeto central composto e dados experimentais para análise da superfície de resposta de 5 níveis e 3 fatores. ....	63
<b>Tabela 15.</b> Análise estatística (ANOVA), incluindo termos de resposta para a construção de modelos preditivos e valores ideais de resposta para os critérios de resposta paramétricos.....	67

## Índice de Equações

<b>Equação 1.</b> Equação para determinação de hidratos de carbono.....	21
<b>Equação 2.</b> Equação para determinação da energia total. ....	21
<b>Equação 3.</b> Equação da determinação da taxa de inibição em ensaio TBARS. ....	35
<b>Equação 4.</b> Percentagem da população de eritrócitos (PE) no ensaio OXHLIA.....	35
<b>Equação 5.</b> Tempo de atraso da hemólise. ....	36
<b>Equação 6.</b> Equação polinomial de segunda ordem usada no modelo matemático.....	40
<b>Equação 7.</b> Modelo polinomial final de segunda ordem para a extração da casca.....	66
<b>Equação 8.</b> Modelo polinomial final de segunda ordem para o extrato.....	67
<b>Equação 9.</b> Modelo polinomial final de segunda ordem para o rendimento recuperado. 67	

## Resumo

Ao longo dos anos, o consumidor tem tido uma preocupação crescente em seguir uma dieta saudável e equilibrada. Deste modo, a preferência por alimentos saudáveis, como frutos e vegetais tem sido cada vez mais evidente, sendo estes uma fonte de moléculas capazes de beneficiar a saúde do consumidor, nomeadamente na prevenção de algumas doenças. O fruto da planta *Solanum melongena* L. (beringela) pertence à família Solanaceae e surge como uma excelente alternativa para integrar uma dieta saudável. Este fruto é uma importante fonte de nutrientes e compostos com potencial bioativo, nomeadamente compostos antociânicos, cujo consumo intervém de forma benéfica na saúde humana e, para além disso, são compostos que constituem uma alternativa aos corantes artificiais utilizados como aditivos na indústria alimentar.

No presente trabalho de investigação foi realizada uma avaliação nutricional, química e bioativa do fruto de *S. melongena* fazendo, separadamente, a avaliação da polpa, epicarpo e do fruto completo. Tendo em conta a cor sugestiva do epicarpo da berinjela, foram realizados ensaios de otimização do procedimento de extração, de modo a obter um extrato corante rico em antocianinas.

O perfil nutricional (teor em proteínas, cinzas, gorduras, hidratos de carbono e energia) foi determinado aplicando metodologias oficiais de análise de produtos alimentares (AOAC), o perfil químico foi avaliado através da determinação dos açúcares livres utilizando um sistema de HPLC-RI, os ácidos orgânicos por UFLC-PDA, os ácidos gordos por GC-FID, os tocoferóis por HPLC-fluorescência e os compostos fenólicos (antociânicos e não antociânicos) por HPLC-DAD-ESI/MS. O potencial bioativo foi avaliado através de ensaios de atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, bem como por ensaios de citotoxicidade e hepatotoxicidade em linhas celulares tumorais humanas e cultura de células primárias não tumorais, respetivamente.

De acordo com os resultados, o fruto de *S. melongena* evidenciou um teor de humidade superior a 90%, aquando da avaliação da polpa e do fruto inteiro. Foi também notório o baixo teor em gordura, hidratos de carbono e valor energético, assim como, a presença de várias moléculas de interesse, nomeadamente açúcares livres (frutose, glucose, sacarose e trealose), ácidos orgânicos (oxálico, quínico, málico e fumárico) e ácidos gordos. Nestes últimos foram identificados 17 compostos, destacando-se o ácido palmítico (C16:0) e o ácido esteárico (C18:0) como maioritários, em ambas as amostras estudadas.

Através da avaliação do perfil individual de compostos fenólicos não antociânicos foram detectados os ácidos protocatecuico e 5-*O*-cafeoilquinico no epicarpo, e um hexósido do ácido cafeico e o ácido 5-*O*-cafeoilquinico na polpa. O perfil individual de antocianina revelou a presença de delphinidina 3-*O*-rutinósido na amostra de epicarpo.

Relativamente à atividade antioxidante, em ambos os ensaios aplicados foram evidentes valores promissores de EC<sub>50</sub>, o que traduziu o excelente potencial bioativo dessa espécie. O mesmo ocorreu com a atividade antimicrobiana, onde foram demonstrados o potencial bacteriostático e bactericida contra algumas estirpes de bactérias. Foi, também, provada a ausência de toxicidade em ambas as amostras testadas.

Posteriormente foi realizada a otimização do processo de extração, aplicando um desenho experimental estatístico, que fornece dados suficientes para modelar matematicamente o comportamento dos fatores de extração e as interações entre eles. Assim, a interpolação numérica permitiu determinar e confirmar o ponto de extração ideal. Neste caso, tendo em conta as diferentes respostas, as condições ótimas de extração do epicarpo, extrato e solvente recuperado foram, respetivamente: Y<sub>1</sub> (solvente = 64%; razão = 5 g/L; e tempo = 0,5 min), Y<sub>2</sub> (solvente = 58%; razão = 5 g/L; e tempo = 0,5 min), e Y<sub>3</sub> (solvente = 54%; razão = 5 g/L; e tempo = 0,5 min). Em valores gerais de otimização para as três respostas envolvidas: com um valor ótimo de incapacidade de 0,99: 58,4% de concentração de etanol (v/v), 5 gramas de *S. melongena* por litro de solvente e 0,5 min de tempo de extração. Estes parâmetros permitiram a obtenção de 11,96 mg de antocianinas por g de extrato, mostrando um aumento significativo comparativamente com a extração convencional (9,2 mg de antocianinas por g de extrato).

Este estudo mostrou que os frutos de *S. melongena* são uma boa opção para uma dieta saudável, evidenciando um baixo teor lipídico e calórico, assim como a presença de moléculas bioativas, como compostos fenólicos. Para além disso, comprovou que o epicarpo deste fruto é rico em pigmentos naturais (antocianinas), podendo gerar grande interesse no setor industrial.

**Palavras-chave:** Antocianinas; Beringela; Bioatividade; Corante natural.

## Abstract

Over the years, the consumer has been increasingly concerned about following a healthy and balanced diet. In this way, the preference for healthy foods, such as fruits and vegetables has been increasingly evident, being these a source of molecules capable of benefiting consumer health, namely in the prevention of some diseases. The fruit of *Solanum melongena* L. plant (eggplant) belongs to the Solanaceae family and appears as an excellent alternative to integrate a healthy diet. This fruit is an important source of nutrients and compounds with bioactive potential, namely anthocyanin compounds, whose consumption has a beneficial effect on human health, and in addition, these compounds are an alternative to artificial colours used as additives in the food industry.

In the present research work, the nutritional, chemical and bioactive evaluation of the fruit of *S. melongena* was carried out, performing separately the evaluation of the pulp, epicarp and the complete fruit (pulp and epicarp). Considering the suggestive colour of eggplant epicarp, tests were carried out to optimize the extraction procedure in order to obtain a colourant extract rich in anthocyanins.

The nutritional profile (protein, ash, fat, carbohydrate and energy content) was determined by applying official methodologies for food analysis (AOAC), while the chemical profile was evaluated by determining free sugars using an HPLC-RI system, organic acids by UFLC-PDA, fatty acids by GC-FID, tocopherols by HPLC-fluorescence and phenolic compounds (anthocyanins and non-anthocyanins) by HPLC-DAD-ESI/MS. The bioactive potential was assessed through tests for antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activity, as well as cytotoxicity and hepatotoxicity tests on human tumor cell lines and non-tumor primary cell culture, respectively.

According to the results, the fruit of *S. melongena* showed a moisture content higher than 90% when evaluating the pulp and the whole fruit. It was also noted low values for fat, carbohydrate and energy, and the presence of various molecules of interest, namely free sugars (fructose, glucose, sucrose and trehalose), organic acids (oxalic, quinic, malic and fumaric) and fatty acids. In the latter, 17 compounds were identified, highlighting palmitic acid (C16:0) and stearic acid (C18:0) as the majority in both studied samples.

Through the evaluation of the individual non-anthocyanin phenolic compounds, protocatechuic and 5-*O*-caffeoylquinic acids were detected in the epicarp, and caffeic acid hexoside and 5-*O*-caffeoylquinic acid were identified in the pulp. The anthocyanin profile revealed the presence of delphinidin 3-*O*-rutinoside in the epicarp.

Regarding the antioxidant activity, both tested assays showed promising values of EC<sub>50</sub>, which translated the excellent bioactive potential of this species. The same happened with the antimicrobial activity, where the bacteriostatic and bactericidal potential against some bacteria strains were demonstrated. Was also proved the absence of toxicity in both resred samples.

Afterwards, the optimization of the extraction process was performed, applying a statistical experimental design, which provides sufficient data to mathematically model the behavior of the extraction factors and the interactions between them. Thus, the numerical interpolation allowed to determine and confirm the optimum extraction point. In this case, taking into account the different responses, the optimal conditions of extraction of the epicarp, extract and recovered solvent were, respectively: Y<sub>1</sub> (solvent = 64%; ratio = 5 g/L; and time = 0.5 min), Y<sub>2</sub> (solvent = 58%; ratio = 5 g/L; and time = 0.5 min), and Y<sub>3</sub> (solvent = 54%; ratio = 5 g/L; and time = 0.5 min). The general optimization values for the three responses involved: with an optimum value of deseability of 0.99, 58.4% of the ethanol concentration (v/v), 5 grams of *S. melonera* per liter of solvent and 0.5 min of extraction time. These parameters allowed the obtention of 11.96 mg of anthocyanins per g of extract, showing a significant increase compared to the conventional extraction (9.2 mg of anthocyanins per g of extract).

This study showed that *S. melongena* fruits are a good option for a healthy diet, showing a low lipid and caloric content, as well as the presence of bioactive molecules, such as phenolic compounds. In addition, was proved that the epicarp of this fruit is rich in natural pigments (anthocyanins), which can generate great interest in the industrial sector.

**Keywords:** Eggplant; Anthocyanins; Natural colorant; Bioactivity

## 1. Introdução

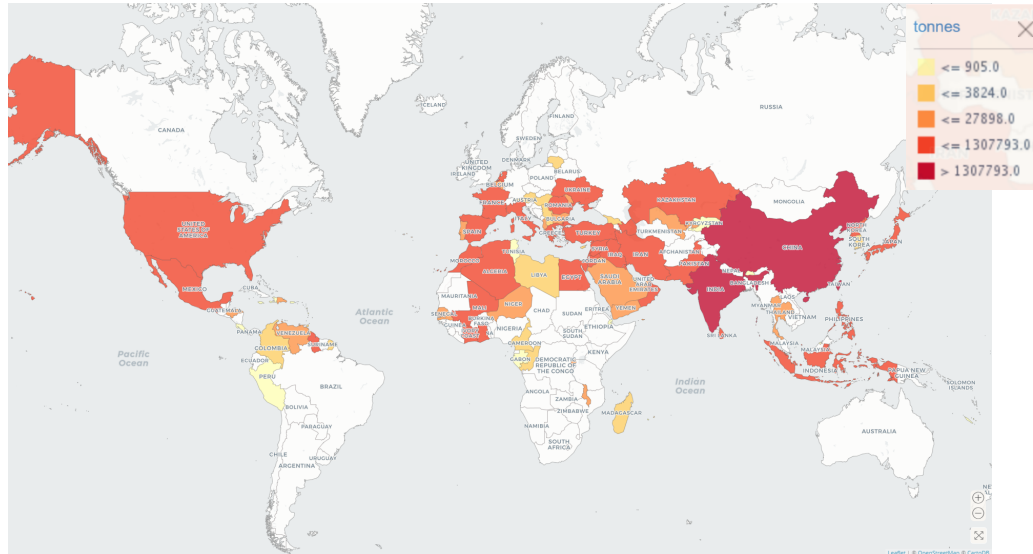
### 1.1. Caracterização do fruto de *Solanum melongena* L.

#### 1.1.1. Etimologia e aplicações

A beringela apresenta-se com nome de origem persa derivado do termo *badnjan* e representa um grande valor agronómico e económico a nível mundial (Gürbüz et al., 2018). *Solanum melongena* L. é uma das principais espécies vegetais e mais produzidas a nível mundial, surgindo em quinto lugar depois da batata, tomate, pimenta e tabaco. Alguns estudos indicam que o cultivo desta espécie teve início na Índia há mais de 4000 anos, propagando-se posteriormente para a China, Filipinas, Japão, Ásia e Europa. Durante o século XIV os comerciantes árabes expandiram o comércio de beringela ao continente africano e, posteriormente, a sua expansão foi feita para as restantes partes do mundo (Taher et al., 2017; Gürbüz et al., 2018).

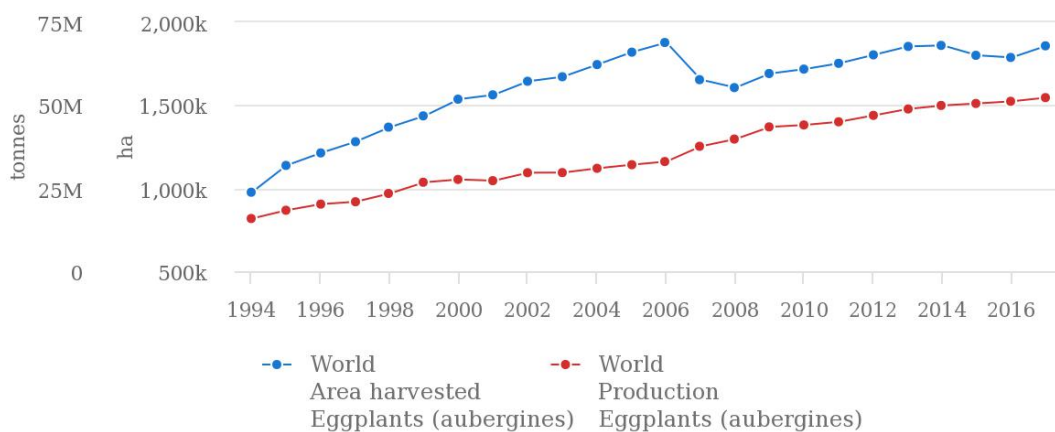
Pertencente à família das Solanaceae, tal como o pimento, tomate e batata, *S. melongena* é cultivada na maioria dos tipos de solo, no entanto, apresenta melhor desenvolvimento em solos profundos, de textura franca ou areno-argilosa e bem drenados. O fruto (beringela) apresenta o seu maior desenvolvimento com temperaturas elevadas e, comercialmente, encontra-se mais disponível no final do verão e outono (Gürbüz et al., 2018).

De acordo com informação disponibilizada pela FAO (Food and Agriculture Organization), em 2017 a produção mundial de beringela alcançou aproximadamente 52 milhões de toneladas, estando a produção concentrada no continente Asiático (**Figura 1**), destacando-se a China como o maior produtor (32,883,567 toneladas), seguido da Índia (12,510,000 toneladas) e Egito (1,307,793 toneladas) (FAOSTAT, 2017).



**Figura 1.** Figura representativa da produção mundial de beringela em 2017 (FAOSTAT, 2017).

Tendo em conta as últimas duas décadas, o cultivo mundial de beringela aumentou exponencialmente (**Figura 2**). Em 1996 a produção apresentou valores de cerca de 20 milhões de toneladas, contudo em 2016 foi visível um aumento acentuado, atingindo valores de aproximadamente 75 milhões de toneladas. Paralelamente ao aumento da produção, a área de colheita também se expandiu significativamente, alcançando em 2017 cerca de 1,8 milhões de hectares (FAOSTAT, 2017).



Source: FAOSTAT (May 12, 2019)

**Figura 2.** Gráfico referente à área de colheita (em hectares) e produção de beringela (em toneladas) a nível mundial, entre os anos de 1994 e 2017 (FAOSTAT, 2017).

O elevado interesse neste fruto surge, particularmente, no setor alimentar, uma vez que apresenta um valor nutricional com baixo teor calórico e alto teor de vitaminas, minerais e compostos bioativos, o que lhe permite ser identificado como um alimento saudável (Taher et al., 2017). Não obstante, associado ao elevado consumo desta matriz está associado um elevado desperdício. Nesse sentido, os frutos que não preenchem os requisitos para serem comercializados, devido à sua aparência não atraente ou em estado avançado de maturação, tornam-se bio-resíduos que podem ser realocados em outras funcionalidades, contribuindo para a sua valorização e diminuição da taxa de desperdício (Kazemi et al., 2019).

A nível culinário é um alimento versátil e faz parte da gastronomia de vários países, sendo utilizado como ingrediente complementar para equilibrar os sabores de outros alimentos (Gürbüz et al., 2018). É muito utilizado na dieta mediterrânica e em receitas vegetarianas. Na indústria alimentar, além de ser encontrada na sua forma natural, a beringela também é comercializada de outras formas, nomeadamente em farinha (que pode ser utilizada como um ingrediente funcional com alto valor nutritivo) (Rodriguez-Jimenez et al., 2018).

Para além do seu interesse na área alimentar, vários autores descrevem aplicações na medicina tradicional, uma vez que já foram evidenciadas capacidades terapêuticas em vários problemas de saúde (Ferarsa et al., 2018; Gürbüz et al., 2018). Este potencial terapêutico manifesta-se devido à sua composição rica em ácido ascórbico e compostos fenólicos, ambos com elevado potencial antioxidante. Nesse sentido, essa ação terapêutica da beringela foi comprovada em tratamentos de verrugas, queimaduras e doenças inflamatórias, tais como, gastrite, estomatite e artrite. Contudo, a sua aplicação mais tradicional é como co-adjuvante no controlo do colesterol (Ames et al., 1993; Di Sotto et al., 2018).

A nível de suplementos alimentares, podem ser encontrados vários produtos industrializados à base de beringela, nomeadamente extratos líquidos, cápsulas com extrato seco ou com beringela pulverizada, associados ou não com extratos de outras plantas. As cápsulas com extrato de beringela são as formulações comumente mais encontradas e, têm como função intervir no tratamento de colesterol, aterosclerose, problemas no fígado e vias biliares, assim como, auxiliar no emagrecimento através da redução do apetite (Brietzig, 2003).

### 1.1.2. Composição química, nutricional e propriedades bioativas

A coloração do fruto de *Solanum melongena* L. (beringela) varia entre roxo escuro e preto e o valor nutricional do fruto fresco caracteriza-se por ter um teor em proteínas de aproximadamente 0,98 g/100 g de massa fresca (mf), um teor em gordura de 0,18 g/100 g mf, um teor em hidratos de carbono de 5,88 g/100 g de mf, um teor em fibra de 3,00 g/100 g de mf e um teor em açúcar de 3,53 g/100 g de mf (**Tabela 1**) (relatório 11209 USDA). Relativamente à composição em ácidos gordos, estudos indicam que os ácidos gordos mais abundantes são os polinsaturados, com valores de aproximadamente 0,076 g/ 100 g de mf (relatório 11209 USDA). O facto de apresentar um teor calórico bastante reduzido (25,0 kcal/100 g mf), torna-o indicado para consumidores que pratiquem dietas com baixo índice de calorias (Rodriguez-Jimenez et al., 2018).

**Tabela 1.** Valor nutricional da berinjela (massa fresca) (relatório 11209 USDA).

<b>Nutriente</b>	<b>Unidade</b>	<b>Valor por 100 g</b>
<b><i>Principais componentes</i></b>		
Água	g	92,3
Energia	kcal	25,0
Proteína	g	0,98
Lípidos	g	0,18
Hidratos de Carbono (calculados por diferença)	g	5,88
Fibra	g	3,00
Açúcar	g	3,53
<b><i>Minerais</i></b>		
Cálcio (Ca)	mg	9,00
Ferro (Fe)	mg	0,23
Magnésio (Mg)	mg	14,0
Fósforo (P)	mg	24,0
Potássio (K)	mg	229,0
Sódio (Na)	mg	2,00
Zinco (Zn)	mg	0,16
<b><i>Vitaminas</i></b>		
Vitamina C	mg	2,20
Tiamina	mg	0,039
Riboflavina	mg	0,037
Niacina	mg	0,649
Vitamina B6	mg	0,084
Folato	µg	22,0
Vitamina B12	µg	0,00
Vitamina A, RAE*	µg	1,00
Vitamina A	µg	6,90
Vitamina E (α-tocoferol)	mg	0,30
Vitamina D (D2+D3)	µg	0,00
Vitamina K	µg	3,50

<b>Ácidos gordos</b>		
Ácidos gordos saturados	g	0,034
Ácidos gordos monoinsaturados	g	0,016
Ácidos gordos polinsaturados	g	0,076
Colesterol	mg	0,000

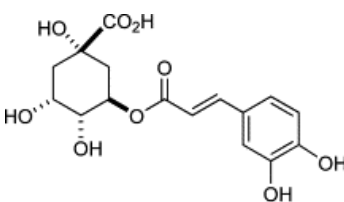
\*RAE: equivalente de atividade de retinol

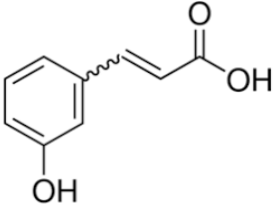
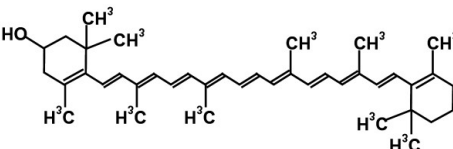
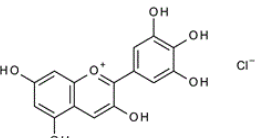
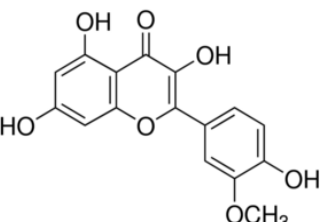
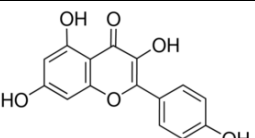
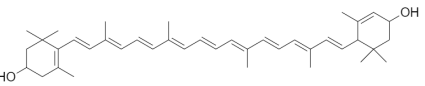
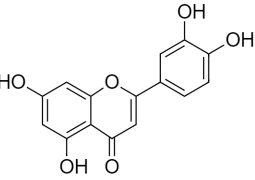
Além dos principais componentes, a beringela possui também micronutrientes, nomeadamente minerais e vitaminas. O mineral e a vitamina mais abundantes no fruto fresco são, respectivamente, o potássio, com um teor de 229,0 mg/100 g de mf, e a vitamina C, com um teor de 2,20 mg/100 g de mf.

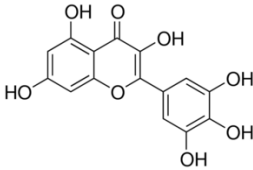
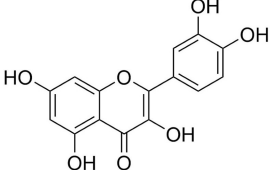
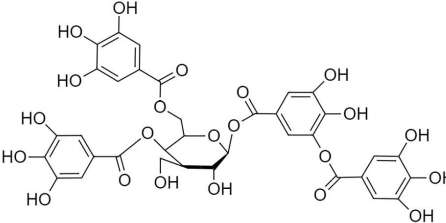
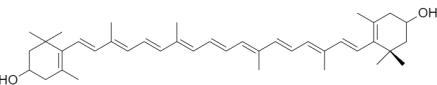
Alguns nutrientes como os hidratos de carbono, proteínas, lípidos e vitaminas são metabolitos primários das plantas, ou seja, são compostos que estão diretamente envolvidos nos seus processos fisiológicos e de desenvolvimento. Já os metabolitos secundários, nomeadamente, compostos fenólicos, glicoalcaloides, carotenoides, entre outras moléculas, não são essenciais para os processos básicos das plantas, no entanto, desempenham funções de defesa contra stresses bióticos e abióticos, e são também compostos de elevado interesse para o ser humano, devido ao seu potencial bioativo (Gürbüz et al., 2018).

Na composição da beringela estão presentes algumas dessas moléculas como compostos fenólicos, glicoalcaloides e carotenóides. Vários desses compostos (taninos e flavonóides, como quercetina e delphinidina) atribuem a este fruto potencial antioxidante, anti-inflamatório, anti-carcinogénico, entre outras bioatividades (**Tabela 2**) (Gürbüz et al., 2018).

**Tabela 2.** Compostos bioativos presentes na composição de beringela e suas aplicações e benefícios para saúde.

<b>Composto</b>	<b>Aplicações e benefícios na saúde</b>	<b>Estrutura química</b>	<b>Referências</b>
Ácido clorogénico	Ação antioxidante, anti-inflamatória, cardioprotetora, anti-carcinogénica e antidiabética, e reduz a gordura visceral.		Di Sotto et al. (2018)

Ácidos hidroxicinâmicos	Ação antioxidante, eliminação de radicais livres e proteção dos efeitos colaterais da quimioterapia.		Gürbüz et al. (2018)
$\beta$ -Criptoxantina	Precursor da vitamina A, atua na prevenção de danos causados por radicais livres às biomoléculas, e na prevenção e tratamento de alguns tipos de cancro.		Gürbüz et al. (2018)
Delfinidina	Reduz significativamente o stress oxidativo e a glicose no sangue e, neutraliza a inflamação vascular.		Noda et al. (2000)
Isoramnetina	Ação antioxidante e antitumoral em células cancerígenas hepatocelulares humanas, atua na prevenção de lesões nas células endoteliais causadas por lipoproteína oxidada de baixa densidade.		Gürbüz et al. (2018)
Canferol	Ação antioxidante e, redução do risco de doenças crónicas e cancro.		Kaume et al. (2012)
Luteína	Ação antioxidante na retina, protegendo o olho da inflamação e do stress oxidativo.		Gürbüz et al. (2018)
Luteolina	Ação biológica e farmacológica, nomeadamente, antioxidante, anti-inflamatória e intervém no tratamento da aterosclerose.		Gürbüz et al. (2018)

Miricetina	Ação antioxidante, citoprotetora, anti-carcinogênica, antivirais, propriedades antimicrobianas e atividade de inibição da agregação plaquetária.		Kaume et al. (2012)
Quercetina	Ação antioxidante, melhora a sobrevivência celular normal, propriedades antivirais, anti-inflamatórias, antibacterianas e de relaxamento muscular.		Kaume et al. (2012)
Taninos	Aumenta a captação de glicose e inibe a adipogênese e a oxidação do colesterol LDL.		Gürbüz et al. (2018)
Zeaxantina	Ação antioxidante e pró-oxidante, efeitos anti-inflamatórios, supressão do stress oxidativo no tecido da retina.		Gürbüz et al. (2018)

Tendo em conta o elevado interesse do consumidor nas propriedades nutricionais e bioativas da beringela e no seu potencial a nível de aplicações terapêuticas, vários estudos têm sido realizados pela comunidade científica a fim de determinar as características nutricionais, químicas e bioativas da planta e do fruto (Nisha et al., 2009; Jung et al., 2011; Niño-Medina et al., 2017; Di Sotto et al., 2018; Gürbüz et al., 2018).

Nisha et al. (2009) desenvolveram um estudo onde compararam diferentes cultivares de frutos de *S. melongena* (verde e de cor púrpura) em termos do seu conteúdo em fenólicos totais, atividade antioxidante e teor total de antocianinas. Os resultados mostraram que os extratos metanólicos obtidos a partir do fruto inteiro fresco de cor púrpura, apresentaram melhor atividade antioxidante que as outras beringelas testadas, o que pode ser atribuído ao maior teor de compostos fenólicos, incluindo antocianinas.

Jung et al. (2011) também realizaram estudos de avaliação de atividade antioxidante da beringela (nomeadamente no cálice, folha, casca, polpa e caule) e os resultados evidenciaram que as maiores concentrações de fenóis totais se encontravam nos extratos obtidos a partir da casca (55,19 mg/g de extrato) e do cálice (121,07 mg/g de extrato). Os resultados também indicam que a atividade antioxidante variou tendo em conta as diferentes partes analisadas e de acordo com o solvente de extração utilizado, destacando-se o cálice com maior atividade antioxidante.

Em 2017, Niño-Medina et al. realizaram um estudo de revisão sobre a presença e estrutura química de compostos fenólicos em beringelas de diferentes espécies e verificaram que as condições utilizadas nos métodos de extração e a variedade dos frutos levam a resultados com grandes diferenças. Em geral, concluíram que todos os estudos incluídos nessa revisão, evidenciaram a delphinidina e o ácido clorogénico como os principais compostos fenólicos na casca e na polpa da beringela, respetivamente.

Por outro lado, uma revisão levada a cabo por Gürbüz et al. (2018) descreve os benefícios fitoquímicos e os efeitos terapêuticos da beringela; referiram que este fruto é uma fonte importante de produtos nutracêuticos e farmacêuticos.

Em 2018, o estudo de Di Sotto et al. avaliou o potencial citoprotetor e atividade anti-herpes de extratos obtidos a partir do fruto de *S. melongena*. Os resultados também demonstraram que os flavonoides representam entre 10% e 15% dos compostos fenólicos totais das amostras de beringela e, que estes se apresentam em maior concentração na casca comparativamente com a polpa. Foram, também, encontradas evidências preliminares sobre o uso da casca do fruto como fonte de compostos nutracêuticos e farmacêuticos para o desenvolvimento de medicamentos anti-herpéticos.

Assim, e de acordo com os vários estudos realizados, é evidente que, comparativamente com outras frutas e legumes, a beringela é uma fonte rica em compostos bioativos, nomeadamente compostos fenólicos, carotenoides e alcaloides. Dentro da família a que pertence (*Solanaceae*), a beringela é considerada a melhor fonte de ácidos fenólicos (Gürbüz et al., 2018).

## **1.2. Antocianinas: caracterização e aplicações na indústria alimentar**

### **1.2.1. Características químicas e propriedades bioativas**

No reino vegetal, a formação da cor depende da concentração dos pigmentos naturais existentes nas plantas. Estes podem ser divididos em quatro grandes grupos: clorofilas (verde),

carotenoides (amarelo, laranja e vermelho), antocianinas (vermelho em meio ácido, azul a roxo em meio alcalino) e betalainas (as betaxantinas que apresentam uma coloração amarela e as betacianinas com coloração vermelha) (Tanaka et al., 2008; Gonçalves et al., 2015).

As antocianinas (do grego, ἀνθός (antho): flor e κυανός (kyanos): azul) são pigmentos derivados de sais flavílicos, hidrossolúveis e associadas a moléculas de açúcar (Okumura et al., 2002; Mazza et al., 2004). Para além de estarem presentes na composição de uma vasta gama de plantas vasculares, estão também presentes como pigmentos em vários frutos vermelhos, tais como: cerejas, ameixas, morangos, framboesas, amoras, uvas, entre muitos outros (Mazza et al., 2004).

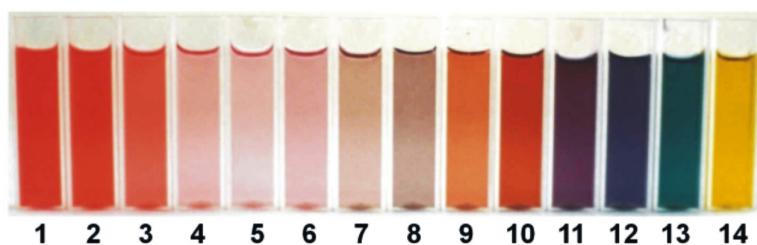
As antocianinas são compostos fenólicos, particularmente flavonoides, responsáveis pela maioria das cores vermelha, roxa e azul das flores e frutos (**Figura 3**). Os compostos fenólicos englobam uma vasta gama de substâncias que possuem em comum um anel aromático com um ou mais grupos substituintes hidroxilo (Grotewold, 2006; Niño-Medina et al., 2017). Nas plantas, além da pigmentação, as antocianinas também exercem a função de atração de polinizadores de sementes e, de proteção das suas flores e frutos contra a luz ultravioleta (UV), atuando como filtro e, melhorando e regulando a fotossíntese (Bobbio & Bobbio, 1995; Kong et al., 2003).



**Figura 3.** Imagem representativa de legumes e frutos com antocianina na sua composição (<http://pt.gmp-factory.com>).

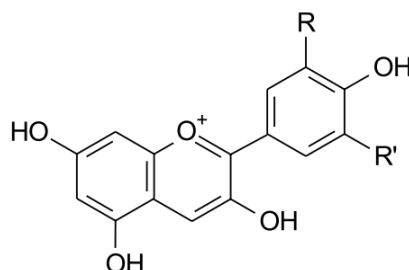
A grande variação das cores, provenientes da presença de antocianinas, é atribuída a vários aspetos, tais como: número correspondente de grupos hidroxilo, grau de metoxilação, natureza, número e posição de monossacáridos ligados ao catião, natureza e número de ácidos carboxílicos ligados aos monossacáridos, derivados acilados de monossacáridos e ao pH do ambiente biológico

(um exemplo é a cianina, que apresenta uma cor vermelha sob condições ácidas, violeta em pH neutro e azul sob condições básicas; **Figura 4**) (Prabhu & Bhute, 2012).



**Figura 4.** Imagem representativa da escala de cores do extrato de amora em valores de pH variando de 1 a 14 (Terci & Rossi, 2002).

Na natureza, as antocianinas encontram-se associadas a moléculas de açúcares; no entanto, quando não possuem açúcares na composição são denominadas antocianidinas (**Figura 5**). De acordo com os substituintes nas posições R e R', a antocianidina possui uma denominação distinta (**Tabela 3**) (Okumura et al., 2002).



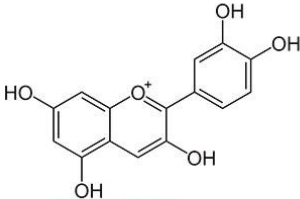
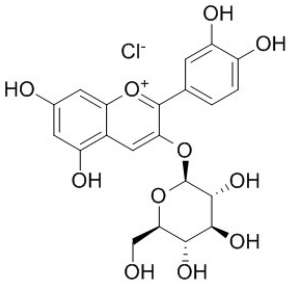
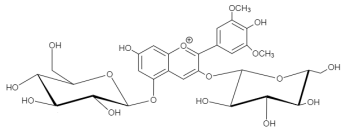
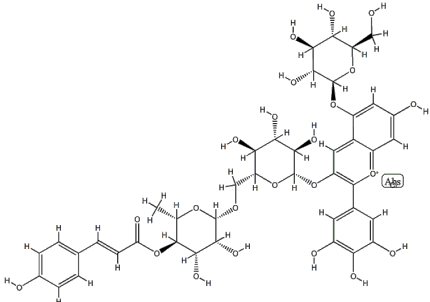
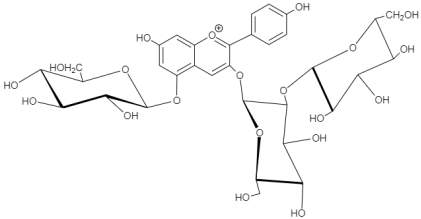
**Figura 5.** Estrutura química de uma antocianidina genérica (Okumura et al., 2002).

**Tabela 3.** Substituintes R e R' para antocianidinas naturais (Okumura et al., 2002).

Antocianidina	R	R'	Cor em meio ácido
Cianidina	OH	H	Magenta
Delfidina	OH	OH	Azul-roxo
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Violeta
Pelargonidina	H	H	Laranja-vermelho
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H	Púrpura
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH	Vermelho-púrpura

As antocianinas mais comuns na natureza são os derivados glucósidos da cianidina (**Tabela 4**). Assim, a cianidina-3-*O*-glucósido e os seus derivados são os compostos antociânicos que têm causado maior impacto, principalmente nas indústrias de corantes e farmacêuticas, devido ao seu excelente efeito como pigmento natural e como agente antioxidante (Kong et al., 2003; Kaume et al., 2012; Xie et al., 2018).

**Tabela 4.** Cianidina e seus derivados.

Composto	Estrutura química
Cianidina	
Cianidina-3- <i>O</i> -glucósido	
Malvina	
Nasunina	
Rubrobrassicina	

Os compostos antociânicos, são cada vez mais valorizados pelo setor industrial devido à sua aplicação como corantes naturais. Contudo, para além do seu potencial corante, exibem também propriedades bioativas relacionadas com a sua elevada atividade antioxidante, atuando na prevenção de várias doenças, tais como doenças coronárias e degenerativas, diabetes, inflamações, redução do risco de obesidade, entre outras (Kaume et al., 2012; Gürbüz et al., 2018). No caso particular da beringela, a nasunina (**Tabela 4**) é o principal pigmento antociânico e desempenha uma forte ação antioxidante, devido à sua capacidade de remover o excesso de ferro. Desta forma, este composto intervém na redução da formação de radicais livres de oxigénio, que se formam quando há excesso de ferro no organismo, causando danos nas células (Das et al., 2011).

A beringela é uma fonte natural de antocianinas, estando estes compostos concentrados no epicarpo e, conseqüentemente, sendo responsáveis pela pigmentação do fruto. A concentração dos pigmentos pode variar entre 80 e 850 mg por kg de epicarpo, com variabilidade devido a fatores agronómicos, genéticos, intensidade e tipo de luz, temperatura, processamento e armazenamento (Dranca & Oroian, 2016). A capacidade antioxidante deste fruto está relacionada com os compostos que conferem a cor do epicarpo e com o tamanho dos frutos, devido à quantidade de compostos bioativos presentes. Fazendo uma comparação entre as diferentes variedades de beringela (nomeadamente verde longo, roxo grande e roxo de tamanho médio), os frutos roxos médios são os que apresentam maior concentração de compostos fenólicos, especialmente antocianinas e, conseqüentemente, maior capacidade antioxidante (Nisha et al., 2009).

### **1.2.2. Técnicas de extração e estabilização**

O potencial corante das antocianinas na indústria alimentar tem chamado à atenção da comunidade científica, por aliar a capacidade de pigmentação aos benefícios que promove na saúde. Dessa forma, os pigmentos naturais não são apenas ingredientes corantes sem valor funcional, mas são também compostos com propriedades bioativas que beneficiam em vários aspetos a saúde e bem-estar do consumidor (Jung et al., 2011; Kaume et al., 2012).

A extração é uma operação de transferência de massa com o objetivo de captar os compostos de interesse de uma matriz, através de processos químicos ou físicos. Ao realizar-se a extração de matrizes vegetais, deve ter-se em consideração a parte da matriz utilizada

(nomeadamente raiz, caule, fruto) e os compostos que se desejam extrair. Os métodos mais comuns utilizados para a extração de compostos são: a maceração e a extração assistida por ultrassons (Vieira, 2015).

A extração por maceração baseia-se na utilização de um solvente para extrair os compostos de interesse da matriz, sob agitação e, usando como variáveis a temperatura, o tempo de extração e o solvente. De outro modo, a extração assistida por ultrassons consiste na aplicação de ondas mecânicas com uma frequência acima do limiar da audição humana (> 20 KHz). Estas ondas são geradas através de um transdutor, que converte energia elétrica em energia mecânica. Neste processo, as variáveis são a potência, o tempo de extração e o solvente (Meregalli, 2017).

Relativamente aos métodos de deteção a aplicar, estes podem variar de acordo com a natureza e complexidade dos compostos, sendo as técnicas cromatográficas as mais utilizadas. A separação por cromatografia baseia-se na distribuição dos compostos em duas fases: uma que permanece imóvel durante o processo (fase estacionária) e outra que passa através dela, a fase móvel (que pode ser líquida, gasosa ou em fluído supercrítico). A cromatografia gasosa (GC) utiliza um gás como fase móvel, e como fase estacionária pode ser um material sólido (GSC) ou líquido distribuído uniformemente sobre um sólido (GLC). A cromatografia líquida utiliza um líquido como fase móvel, e a fase estacionária pode ser sólida (LSC) ou líquida (LLC). As técnicas de cromatografia líquida mais utilizadas atualmente são HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*; cromatografia líquida de alta eficiência) e UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*; cromatografia líquida de ultra-eficiência) (Scientia Chromatographica, 2016). Em 2011, Nogueira et al. realizaram um estudo de revisão onde concluíram que a técnica de UPLC, em comparação com HPLC, pode apresentar melhor relação custo-benefício a médio ou longo prazo, além de minimizar os impactos ambientais devidos ao uso reduzido de solventes.

Relativamente ao caso particular das antocianinas, de acordo com estudos realizados por diversos autores (nomeadamente Nisha et al., 2009; Jung et al., 2011; Niño-Medina et al., 2017; Di Sotto et al., 2018; Gürbüz et al., 2018), a extração deve ser feita com uma solução ácida (ácido acético, ácido clorídrico, ácido cítrico, etc.), com um álcool (metanol, etanol, etc.) e mantendo os extratos refrigerados e ao abrigo da luz. Devido a facilidade de hidrólise dos açúcares presentes, a extração de compostos antociânicos sob aquecimento em meio ácido requer cuidado, pois a hidrólise completa dos açúcares ligados à antocianidina central ocorre em 1h a 60 °C, na presença

de HCl 1% em etanol. Em tempos intermediários, pode ocorrer a hidrólise parcial, obtendo-se misturas de agliconas e compostos ligados a açúcares.

No entanto, estudos mais recentes revelaram que a acetona e o etanol também podem ser utilizados como solventes de extração. E ainda, que a utilização de ácido hipoclorídrico na concentração de 0,12 mol/L causa hidrólise parcial das antocianinas aciladas (Kong et al., 2003).

São vários os fatores que interferem na estabilidade dos compostos antociânicos, particularmente o pH, a temperatura, a estrutura química, a luz, a presença de oxigênio, a degradação enzimática e a degradação na presença de outros componentes alimentares (nomeadamente ácido ascórbico, íons metálicos, açúcares e co-pigmentos). Deste modo, torna-se indispensável definir as condições ótimas de extração do pigmento, de forma a não ocorrerem alterações significativas das suas características físicas e químicas (Malacrida & Motta, 2006).

O efeito do pH é um dos parâmetros mais importantes quando se aplicam as antocianinas como ingrediente corante. Em soluções ácidas, os compostos antociânicos apresentam uma coloração vermelha, no entanto, com o aumento do pH a intensidade de cor diminui e, em solução alcalina, obtém-se a cor azul, porém de forma instável. No entanto, esta coloração de tonalidade azul passa para amarela à medida que o pH se aproxima de 14, como resultado indireto da formação de chalcona (Kong et al., 2003; Lopes et al., 2007).

A temperatura é, também, outro parâmetro importante a ter em conta quando se trata da estabilidade dos compostos antociânicos. À medida que a temperatura aumenta (ou seja, temperaturas superiores a 35 °C) a degradação dos compostos aumenta. Mesmo estando ligados a outros compostos estabilizantes, como o ácido tânico, a degradação devido à temperatura pode ocorrer, tornando-se ainda mais acentuada com o aumento do pH do meio (Lopes et al., 2007).

Relativamente à estrutura química, o grau de hidroxilação exerce um efeito importante na estabilidade das antocianinas, sendo que aquelas que contêm mais grupos hidroxilo na sua estrutura são menos estáveis. Inversamente, um alto grau de metoxilação aumenta a estabilidade das antocianinas (Malacrida & Motta, 2006).

A presença de oxigênio também interfere na estabilidade das antocianinas, sendo que a degradação destes compostos, devido à presença de oxigênio, ocorre através de um mecanismo de oxidação direta ou indireta dos constituintes do meio que reagem com as antocianinas (Lopes et al., 2007).

A estabilidade das antocianinas pode ser melhorada com a presença de catiões de alumínio, ferro e outros metais, pela ocorrência de formação de produtos insolúveis. Estes produtos, em relação às antocianinas livres, principalmente no caso do alumínio, apresentam maior estabilidade frente a fatores como calor, pH e oxigênio (Bobbio & Bobbio, 1995). Outro dos fatores que poderá melhorar a estabilidade das antocianinas é a co-pigmentação intermolecular entre antocianinas e com outros compostos (por exemplo, ácido tânico). Esta interação pode causar o aumento da intensidade da cor. Compostos como aminoácidos, ácidos orgânicos e alcaloides podem aumentar a estabilidade das antocianinas e reduzir significativamente os seus níveis e degradação (Ferarsa et al., 2018).

Deste modo, tendo em conta a fragilidade de estabilização das antocianinas terão de ser utilizados métodos de extração cuidadosamente preparados e com monitorização, ao longo de todo o processo, com um maior número de parâmetros que representam um fator de interferência. A determinação de condições ótimas é essencial para a obtenção de índices de extração convenientes (Ferarsa et al., 2018).

### **1.2.3. Aplicações na indústria alimentar**

A utilização de corantes naturais de origem animal, vegetal ou mineral é uma das práticas mais antigas da humanidade em diversos setores. Existem evidências do uso de corantes em tecidos datados desde o período neolítico, nomeadamente na China, em que se refere que o tingimento com plantas e insetos surgiu há mais de 5 mil anos. Também os egípcios utilizavam estes aditivos, não só para decorar com pinturas o interior dos palácios, mas também em produtos cosméticos (maquilhagem) (Prado & Godoy, 2003).

O facto de a cor representar um papel fundamental e decisivo na indústria alimentar, no que concerne à aceitação dos produtos por parte dos consumidores e, a dificuldade associada à aplicação dos aditivos naturais, levou à necessidade do desenvolvimento de corantes artificiais em alimentos e bebidas, a fim de tornar mais apelativa a aparência original do produto, atribuindo cor ou reforçando as cores originais dos produtos (Velo, 2012). Assim, os aditivos artificiais surgiram em 1856, com a síntese do primeiro corante derivado da hulha, desenvolvido por Sir William Henry Perkin. O precipitado roxo foi descoberto por engano na tentativa de sintetizar quinina. No entanto, a continuação dos estudos levou a que, dois anos mais tarde, um corante vermelho artificial fosse patenteado em França. Desde então, nos Estados Unidos e na Europa

foram desenvolvidos mais de uma centena de corantes (Prado & Godoy, 2003; Food Ingredients Brasil, 2009).

Habitualmente, na indústria alimentar são aplicados corantes artificiais como aditivos químicos. Desta forma, os corantes artificiais são substâncias complementares, adicionadas em doses controladas que têm a função de conferir ou melhorar a cor de um produto alimentar (Prado & Godoy, 2003).

Contudo, ao longo dos anos várias questões foram sendo colocadas e, em 1906, surgiram os primeiros estudos acerca da ação cancerígena de alguns corantes artificiais, havendo a necessidade de estabelecer legislação para controlar o seu uso. Assim, existe atualmente uma legislação rigorosa relativa a aditivos corantes permitidos para alimentos e bebidas (Lopes et al., 2007; Prado & Godoy, 2003).

O crescente interesse dos consumidores por produtos mais saudáveis, naturais e *eco-friendly* tem vindo a aumentar e, nesse sentido, a procura de novas fontes de antocianinas como corantes alimentares naturais tem sido um dos objetivos primordiais da comunidade científica (Todaro et al., 2009).

No entanto, a aplicação destes compostos naturais na indústria também exhibe algumas desvantagens, comparativamente com os aditivos artificiais com a mesma função. Algumas dessas desvantagens prendem-se com a sua instabilidade, verificada na mudança de coloração provocada pelas diferentes reações químicas que podem surgir, visto que no caso das antocianinas possuem grupos cromóforos sensíveis às alterações de pH do meio (Andersen et al., 1998). Ao longo da preparação e processamento dos alimentos, a presença de antocianinas pode decrescer até 50%, devido à sua solubilidade em água. No entanto, para além da adição de cor, as antocianinas também conferem propriedades antioxidantes aos alimentos, contrariamente aos corantes artificiais que apenas manifestam a função corante (Malacrida & Motta, 2006; Lopes et al., 2007). Assim, a ação bioativa manifestada por estas moléculas aumenta a necessidade da comunidade científica em estudar com rigor a extração destes compostos, assim como desenvolver tecnologias que permitam a sua estabilidade em qualquer um dos setores industriais, em particular no setor alimentar.

## 2. Objetivos

Tendo em conta as potencialidades nutricionais e bioativas da polpa dos frutos de *Solanum melongena* L. (beringela) e os compostos corantes presentes no epicarpo, o presente estudo tem como principal objetivo caracterizar do ponto de vista químico e nutricional a polpa, epicarpo e fruto inteiro de *S. melongena*, adquiridos num estabelecimento comercial em Bragança, Portugal. É também objetivo deste trabalho, proceder à avaliação das suas propriedades bioativas e otimização de metodologias para a obtenção de um extrato rico em antocianinas, a partir do epicarpo de *S. melongena*, a fim de ser utilizado como um ingrediente corante natural.

Assim, os objetivos específicos deste trabalho experimental são os seguintes:

- ✓ Determinação do valor nutricional da polpa e do fruto inteiro (polpa e epicarpo) de *S. melongena* através de metodologias oficiais de análise de alimentos (AOAC);
- ✓ Determinação da composição química da polpa e do fruto inteiro (polpa e epicarpo) de *S. melongena* recorrendo a técnicas cromatográficas, analisando o perfil de açúcares livres, ácidos gordos, tocoferóis, ácidos orgânicos e compostos fenólicos;
- ✓ Determinação do potencial bioativo de extratos hidroetanólicos obtidos a partir da polpa e do fruto inteiro de *Solanum melongena* L., através de ensaios que avaliam a atividade antioxidante, citotóxica, anti-inflamatória e antimicrobiana;
- ✓ Otimização da extração de antocianinas a partir do epicarpo de *S. melongena*, realizada mediante extração assistida por ultrassons (UAE), aplicando o método de análise de superfície de resposta (RSM);

### **3. Material e métodos**

#### **3.1. Preparação da amostra**

Os frutos de *Solanum melongena* L. (beringela) utilizados para este estudo foram adquiridos em abril de 2019, numa superfície comercial, em Bragança (nordeste de Portugal). Após a aquisição das amostras, o epicarpo e a polpa foram separados através de métodos mecânicos, e foi feita a seleção das amostras para a análise de diferentes partes do fruto (fruto inteiro, polpa e epicarpo). Posteriormente toda a amostragem preparada foi congelada, desidratada através de um processo de liofilização (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EUA) e triturada até obtenção de um pó fino. As amostras foram, seguidamente, armazenadas em local fresco e seco ao abrigo de luz, para posteriormente proceder à realização das análises nutricionais, químicas, bioactivas e processos de otimização.

#### **3.2. Padrões e reagentes**

##### **3.2.1. Análise química**

Os solventes n-hexano 95%, acetonitrilo 99%, etanol absoluto (99,9%) e acetato de etilo 99,98%, todos de grau HPLC, foram adquiridos na empresa Fisher Scientific (Lisboa, Portugal) e o solvente metanol de grau analítico, foi adquirido na empresa Pronalab (Lisboa, Portugal). Os restantes solventes usados, igualmente de grau analítico foram os seguintes: éter etílico (Lab-Scan, Lisboa, Portugal); tolueno e ácido sulfúrico (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA).

A mistura padrão com 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (C4-C24; norma 47885-U) foi adquirida na empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), assim como os padrões de açúcares (D(-)-frutose D(+)-sacarose, D(+)-glucose, D(+)-trealose, D(+)-melezitose e D(+)-rafinose pentahidratada), padrões de ácidos orgânicos (L(+)-ácido ascórbico; ácido cítrico; ácido málico; ácido oxálico; ácido succínico; ácido fumárico e ácido quinico) e padrões de tocoferóis (isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ). Relativamente aos padrões dos compostos fenólicos não antociânicos utilizados (apigenina-6-C-glucósido, ácido cafeico, ácido elágico, ácido clorogénico, hesperetina, luteolina-7-O-glucósido, naringenina, quercetina-3-O-rutinósido, quercetina-3-O-glucósido, taxifolina, ácido rosmarínico) foram adquiridos na Extrasyntheses (Genay Cedex, França) e os compostos antociânicos (cianidina-3-O-glucósido, peonidina-3-O-glucósido e pelargonidina-3-O-glucósido) foram adquiridos na empresa Polyphenols (Sandnes, Norway). A água foi tratada

previamente à sua utilização pelo sistema de purificação Milli-Q-Water (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, EUA).

### **3.2.2. Estudo das bioatividades**

Análise da atividade citotóxica e hepatotóxica: O sêrum fetal de bovino (SFB), a L-glutamina, a solução salina de Hank's (HBSS), a solução de penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100 mg/mL, respetivamente) e o meio DMEM (meio de cultura para células animais (Dulbecco Modified Eagle)) foram adquiridos na empresa Hyclone (Logan, Utah, EUA). O ácido acético, elipticina, sulforodamina B (SRB), ácido tricloroacético (TCA) e Tris foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A água foi tratada como referido anteriormente na *secção 3.2.1.*

Atividade anti-inflamatória: As células RAW 264.7 foram compradas à ECACC ("European Collection of Animal Cell Culture") (Salisbury, UK) e o DMEM à Hyclone (Logan, Utah, USA). O Griess Reagent System Kit foi adquirido da Promega (Madison, WI, USA).

Análise da atividade antimicrobiana: O Mueller-Hinton agar (MHB) foi obtido na Biolab® (Hungria). O composto p-iodonitrotetrazolium chloride (INT) foi adquirido da Panreac Applichem (Barcelona, Espanha). Os antibióticos imipenem e vancomicina foram obtidos da Hikma farmacêutica (Portugal SA) e a Ampicilina da Janssen farmacêutica (Bélgica).

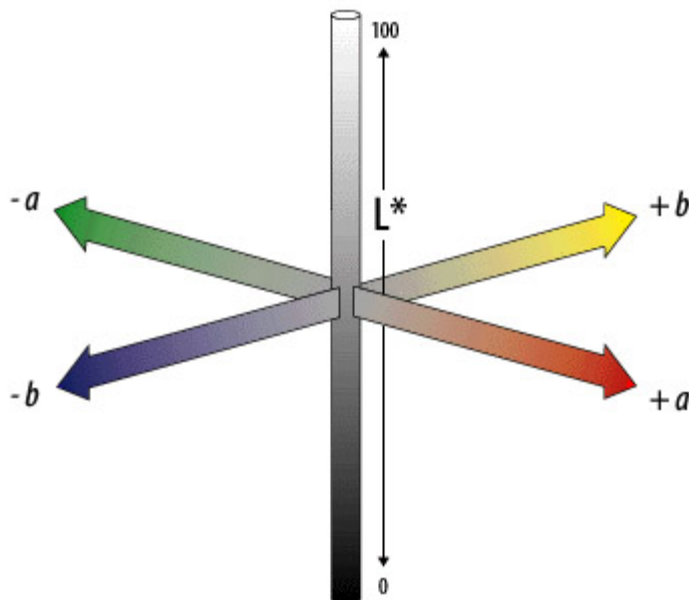
Análise da atividade antioxidante: O padrão trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico), AAPH foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

### **3.3. Avaliação da cor do epicarpo dos frutos de *Solanum melongena* L.**

A medição da cor das amostras foi realizada no epicarpo, utilizando um colorímetro (modelo CR-400; Konica Minolta Sensing, Inc., Tóquio, Japão) acoplado a um adaptador para materiais granulados (modelo CRA50), seguindo a metodologia previamente descrita por Roriz et al. (2017).

O valor das coordenadas tridimensionais CIE  $L^*$ ,  $a^*$   $b^*$ , foram obtidos num sistema computadorizado com um iluminante tipo C e um diafragma de diâmetro 8 mm, sendo que para o processamento dos dados, recorreu-se ao software Spectra Magic Nx (versão CM-S100W

2.03.0006, Konica Minolta, Japão). Relativamente às coordenadas tridimensionais obtidas,  $L^*$  representa a luminosidade,  $a^*$  representa a cromaticidade num eixo do verde (-) a vermelho (+), e  $b^*$  representa a cromaticidade num eixo do azul (-) ao amarelo (+), como ilustrado na **Figura 6**.



**Figura 6.** Coordenadas tridimensionais CIE  $L^* a^* b^*$  (Bora et al., 2015).

A avaliação da cor foi realizada no epicarpo do fruto fresco e no epicarpo liofilizado. Foram feitas leituras em 3 pontos distintos para cada amostra, considerando-se os valores médios. Previamente e após a análise, o instrumento utilizado foi calibrado com um padrão branco (Spectra Magic NX Instruction Manual, Konica Minolta Sensing, Inc., 2009, Japão).

#### **3.4. Determinação do valor nutricional dos frutos de *Solanum melongena* L.: polpa e fruto inteiro**

A composição nutricional foi avaliada na polpa e no fruto inteiro de *S. melongena*, através de metodologias oficiais de análise de alimentos (AOAC, 2016). Para tal, foi determinado o teor de proteína, gordura, hidratos de carbono, cinzas, humidade e valor energético.

O teor em proteínas ( $N \times 6.25$ ) foi obtido pelo método macro-Kjeldahl (AOAC 991.02), o qual se baseia na quantidade de azoto presente na amostra. Para tal, adiciona-se ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ) à amostra (0,5 g) ocorrendo, desta forma, a digestão da matéria orgânica e

consequente formação de um sal inorgânico, o sulfato de amônio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , no qual é retido o azoto. De seguida, alcaliniza-se a solução por adição de hidróxido de sódio (NaOH), que potencia a libertação de azoto na forma de amoníaco,  $\text{NH}_3$ . O amoníaco é, de seguida, destilado e recolhido numa solução de ácido conhecido, neste caso,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,1 M). Por fim, é feita uma titulação com NaOH (0,1 M), utilizando um indicador vermelho de metilo, que permite quantificar o azoto presente na amostra (AOAC 991.02).

Os lípidos foram determinados através da extração de uma massa conhecida de amostra (3 g), num aparelho de Soxhlet, para a qual se utilizou como solvente de extração o éter de petróleo a uma temperatura de aproximadamente 80 °C, durante 7 horas (AOAC 989.05).

Para a obtenção do teor em cinzas, fez-se uma incineração a  $550 \pm 15^\circ\text{C}$  durante 12 horas (AOAC 935.42).

Para a determinação da humidade presente na amostra, colocou-se uma quantidade conhecida de amostra (1 g) na estufa (105 °C) até se obter uma massa constante.

Os hidratos de carbono foram calculados por diferença (**Equação 1**), enquanto que a energia total foi determinada de acordo com a **Equação 2**, apresentada abaixo.

$$\text{Hidratos de carbono} = 100 - (g \text{ proteínas} + g \text{ lipídios} + g \text{ cinzas})$$

**Equação 1.** Equação para determinação de hidratos de carbono.

$$\text{Energia (Kcal)} = 4 \times (g \text{ proteínas} + g \text{ hidratos de carbono}) + (9 \times g \text{ gordura})$$

**Equação 2.** Equação para determinação da energia total.

### **3.5. Determinação da composição química dos frutos de *Solanum melongena* L.: polpa e fruto inteiro**

#### **3.5.1. Açúcares**

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), conforme descrito anteriormente por Barros et al. (2013).

A amostra (1 g) foi enriquecida com melezitose (utilizada como padrão interno, 25 mg/mL) e adicionados 40 mL de etanol (80:20, v/v), num banho a 80 °C (Julabo, SW22; Seelbach, Alemanha), durante 1 hora e 30 min, com agitação a cada 15 minutos.

Posteriormente, o sobrenadante obtido foi centrifugado (centrífuga refrigerada K24OR, Centurion, Sussex Ocidental, Reino Unido) a 5000 *rpm* durante 10 minutos e transferido para um balão de vidro para evaporar a fração etanólica, recorrendo-se ao evaporador rotativo (Büchi R-210, Flawil, Suíça) (60 °C, pressão reduzida). A fase aquosa foi lavada 3 vezes com éter dietílico (10 mL), tendo sido, seguidamente, os restos do mesmo evaporados. Ao resíduo seco obtido, foi adicionada água até perfazer um volume final de 5 mL e filtrou-se 1,5 mL do mesmo (filtros de nylon - 0,2 µm, Whatman) para um vial, a fim de proceder à análise do perfil em açúcares no sistema HPLC.

O sistema de HPLC encontra-se equipado com uma bomba (Knauer, Sistema Smartline 1000, Berlim, Alemanha), um sistema desgaseificador (Smartline manager 5000), um amostrador automático (AS-2057 Jasco, Easton, Maryland, EUA) e um detetor de índice de refração (Knauer Smartline 2300). A separação cromatográfica foi obtida através de uma coluna Eurospher 100-5 NH2 (4,6 x 250 mm, 5 µm, Knauer), que operou a uma temperatura de 35 °C (7971 R Grace).

Como fase móvel foi usado acetoneitrilo/água desionizada (70:30; v/v) com um caudal de 1 mL/min, sendo o volume de injeção de 10 µL. Para a identificação dos compostos, recorreu-se ao software Clarity 2,4 Software (DataApex), com o qual se compararam os tempos de retenção relativos dos picos da amostra, com padrões conhecidos. Os resultados foram obtidos pelo método do padrão interno e expressos em grama de composto por 100 g de massa fresca.

### 3.5.2. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos foram determinados através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de díodos (UFLC-DAD), de acordo com um procedimento previamente descrito por Barros et al. (2013).

A extração foi realizada ao abrigo da luz adicionando 25 mL de ácido metafosfórico (4,5%) à amostra (1,5 g), mantendo as condições de temperatura de 25 °C e agitação constante (150 *rpm*) durante 45 minutos. Após extração, a mistura foi filtrada através de papel de filtro (Whatman N° 4) e, posteriormente, através de filtros de nylon (0,2 µm; Whatman) para análise em UFLC (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). A separação dos mesmos foi obtida através de uma coluna

SphereClone (Phenomenex, Torrance, California, EUA) de fase inversa C18 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm i.d.) termostaticada a 35 °C, sendo a eluição realizada com ácido sulfúrico (3,6 mM) com um caudal de 0,8 mL/min, sendo o volume de injeção de 20 µL.

A detecção dos ácidos orgânicos foi conseguida recorrendo a um sistema DAD, aplicando os comprimentos de onda de 215 nm e 245 nm (para o ácido ascórbico). A quantificação dos compostos foi efetuada por comparação da área dos seus picos registados, nos comprimentos de onda referidos anteriormente, com as curvas de calibração obtidas a partir dos padrões do respetivo composto. Os resultados foram expressos em mg de composto por 100 g de massa fresca.

### 3.5.3. Tocoferóis

Os tocoferóis foram analisados através de um sistema HPLC acoplado a um detetor de fluorescência (HPLC-FL), segundo um procedimento descrito por Barros et al. (2013).

Para realizar o processo de extração, à amostra de frutos (500 mg) foi adicionada uma solução de BHT em hexano (10 mg/mL; 100 µL) e uma solução de tocol (usado como padrão interno - PI) em hexano (50 µg/mL; 400 µL). A amostra foi, de seguida, homogeneizada com 4 mL de metanol (vórtex, 1 minuto) e ainda, com 4 mL de hexano (vórtex, 1 minuto). Após homogeneização da amostra, adicionou-se uma solução aquosa concentrada de NaCl (2 mL), homogeneizando-se (vórtex, 1 min) e centrifugando-se (5 min; 5000 rpm; 10 °C). O sobrenadante obtido foi transferido para um vial e re-extraído o mesmo duas vezes com hexano. Posteriormente, ao extrato obtido, adicionou-se sulfato de sódio anidro, a fim de desidratar o sobrenadante, que foi levado à secura sob corrente de azoto. Por fim, redissolveu-se o extrato obtido em n-hexano (2 mL) e filtrou-se através de um filtro nylon (0,2 µm; Whatman) para um vial âmbar para posterior análise.

O sistema HPLC (descrito previamente na *secção 3.5.1.*) utilizado para a análise dos compostos, encontrava-se acoplado a um detetor de fluorescência (FP-2020; Jasco), programado para excitação ( $\lambda_{ex}$ ) a 290 nm e emissão ( $\lambda_{em}$ ) a 330 nm. A separação cromatográfica foi obtida com uma coluna de fase normal Poliamida II (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm, YMC Waters, Milford, EUA) com uma temperatura de 35 °C. Como fase móvel, usou-se uma mistura de n-hexano e acetato de etilo (70:30, v/v) com um caudal de 1 mL/min, sendo o volume de injeção de 10 µL.

A identificação dos compostos foi realizada através de comparações cromatográficas de compostos padrão. A quantificação foi obtida pelo método do padrão interno, com base em curvas

de calibração de compostos padrão. A análise de dados foi executada com o software Clarity 2,4 (DataApex) e os resultados foram expressos em mg de composto por 100 g de massa fresca.

#### 3.5.4. Ácidos gordos

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID), como descrito anteriormente por Pereira et al. (2012).

Ao extrato lipídico obtido previamente por extração em Soxhlet, foram adicionados 5 mL de uma solução de metanol/ácido sulfúrico/tolueno, na proporção 2:1:1 (v/v/v) e a mistura permaneceu num banho (Julabo, SW22; Seelbach, Alemanha) a 50 °C (com agitação de 160 rpm) durante aproximadamente 12 h. Após retirar os tubos do banho e, com o intuito de potenciar a separação de fases, foi adicionada água desionizada (3 mL) na mistura e, posteriormente, para recuperação dos esteres metílicos de ácidos gordos (FAME) adicionou-se éter dietílico (3 mL), ambos os passos com agitação em vórtex. Após separação das fases, transferiu-se o sobrenadante para um vial, no qual se adicionou previamente sulfato de sódio anidro, a fim de desidratar o sobrenadante. Por último, filtrou-se o mesmo através de filtros de nylon (0,2 µm; Whatman; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para um vial, para posterior análise em GC.

O perfil de ácidos gordos foi obtido através de um sistema de GC (Modelo DANI GC 1000) equipado com um injetor split/splitless, um detetor de ionização de chama (FID, 260 °C) e uma coluna Zebron-Kame (30 m x 0,25 mm ID x 0,20 µm df; Phenomenex, Lisboa, Portugal). O programa de temperatura aplicado foi o seguinte: temperatura inicial de 100 °C, durante 2 min; aumento progressivo da temperatura: 10 °C/min até 140 °C; 3 °C/min até 190 °C; 30 °C/min até 260 °C que permaneceu durante 2 min. O gás de transporte utilizado foi o hidrogénio com um caudal de 1,1 mL/min, medido a 100 °C. A injeção split (1:50) foi realizada a 250 °C, onde foi injetado 1 µL da amostra.

A identificação de ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos de FAME das amostras com padrões conhecidos. Para o processamento dos resultados, recorreu-se ao software CSW 1,7 (DataApex 1,7, Praga, República Checa) e estes foram expressos em percentagem relativa (%) para cada ácido gordo detetado.

### 3.5.5. Compostos fenólicos

A análise dos compostos fenólicos não antociânicos foi realizada no epicarpo, na polpa e no fruto inteiro de *S. melongena*; de outro modo, a determinação dos compostos fenólicos antociânicos foi determinada apenas no epicarpo, devido à sua evidente coloração roxa. Para tal seguiu-se uma metodologia previamente descrita pelos autores Bessada et al. (2016) e Gonçalves et al. (2017).

#### 3.5.5.1. Compostos fenólicos não antociânicos

*Procedimento de extração.* Foi preparado um extrato a partir do material vegetal seco. A amostra liofilizada (frutos de *S. melongena*) (1 g) foi submetida a maceração com uma solução de etanol/água (80:20, v/v; 30 mL) à temperatura ambiente, com agitação constante (150 rpm) durante 1 hora. Posteriormente, foi filtrada através de um papel de filtro (Whatman No. 4; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e o processo foi repetido, sendo a amostra re-extraída com 30 mL da mesma solução hidroetanólica. Por fim, a fração alcoólica dos extratos obtidos foi evaporada a pressão reduzida (Büchi R-210, Flawil, Suíça) e a fração aquosa foi liofilizada (47 °C, 0.045 bar; FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EUA) para posteriores análises. Uma quantidade do extrato seco obtido (10 mg) foi, posteriormente, re-dissolvido numa solução de EtOH/H<sub>2</sub>O (20:80, v/v; 2 mL) e seguidamente, filtrado através de discos LC descartáveis de 0,22-µm para posterior análise em HPLC.

*Método analítico.* Para a análise cromatográfica foi utilizado um sistema Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) equipado com uma bomba quaternária, um injetor automático (a 5 °C), um degasificador e um compartimento de coluna com termóstato automatizado. A deteção dos compostos foi efetuada com detetor de díodos (DAD), usando os comprimentos de onda de 280 nm, 330 nm e 370 nm e acoplado a um detetor de espectrometria de massa (MS).

Para a separação dos compostos, utilizou-se uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 de fase reversa C18 (4,6 x 150 mm, 3 µm; Milford, EUA) termostaticada a 35 °C. A fase móvel utilizada foi (A) ácido fórmico/água (0,1%) e (B) acetonitrilo. O gradiente de eluição estabelecido foi isocrático: 10% a 15% B até 5 min, 15-20% B até 5 min, 20-25% B 10 min, 25-35% B 10 min, 35-50% B 10 min e reequilíbrio da coluna por 10 min; sendo definida uma taxa de fluxo de 0,5

mL/min. O sistema de HPLC descrito encontrava-se também interligado a um espectrômetro de massa (MS).

A detecção de MS foi feita utilizando um espectrômetro de massa Ion Trap Linear LTQ XL (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA), equipada com uma fonte ESI (fonte de ionização electrospray). O gás de arraste utilizado foi azoto (50 psi); o sistema trabalhou com uma voltagem de spray de 5 kV, a uma temperatura inicial de 325 °C e tensão capilar de -20 V. A voltagem do tube lens offset foi mantida a -66 V. Os espectros foram gravados em modo de ião negativo entre 100 e 1500 m/z. A energia de colisão utilizada foi de 35 (unidades arbitrárias). Os dados foram recolhidos e analisados utilizando o programa Xcalibur® (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA).

Para a identificação dos compostos procedeu-se à comparação dos dados obtidos (tempos de retenção, espectros UV-Vis e espectros de massa) com dados disponíveis na literatura e, quando disponíveis, com os padrões. Para análise quantitativa, obtiveram-se as curvas de calibração por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas (2,5-100 µg/mL): ácido cafeico ( $y = 388345x + 406369$ ), ácido protocatequico ( $y = 214168x + 27102$ ) e ácido clorogénico ( $y = 168823x - 161172$ ), baseadas nos sinais UV-Vis e utilizando o comprimento de onda máximo de absorção de cada composto padrão. Nos casos em que não se verificou disponibilidade de padrões para os respetivos compostos, a quantificação foi feita através de curvas de calibração de compostos do mesmo grupo fenólico. Os resultados foram expressos em mg de composto por g de extrato.

#### **3.5.5.2. Compostos fenólicos antociânicos**

*Procedimento de extração.* As amostras liofilizadas dos frutos (1 g) foram sujeitas a uma maceração, realizada à temperatura ambiente, com agitação magnética, durante 1h, com uma solução de EtOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v; 30 mL) acidificada com ácido cítrico (0,5 %). De seguida, foram filtradas através de papel de filtro (Whatman nº4), e o restante resíduo re-extraído com a solução de extração descrita anteriormente. Com o objetivo de eliminar o etanol, o filtrado foi evaporado a 35 °C (evaporador rotativo, Büchi R-210, Flawil, Suíça) e a fração aquosa restante liofilizada (-47 °C, 0.045 bar; FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EUA). O extrato obtido foi, posteriormente, re-dissolvido numa solução de EtOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v; 1 mL) e seguidamente, filtrados através de discos LC descartáveis de 0,22-µm para posterior análise em HPLC.

Método analítico. As antocianinas foram analisadas usando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Dionex UltiMate 3000 UPLC, Thermo Scientific) descrita na **secção 3.5.5.1.** Para a separação dos compostos e recorreu-se a uma coluna de fase reversa AQUA® C18 (5 µm, 150 mm x 4,6 mm i.d., Phenomenex) termostaticada a 35 °C. Os solventes usados foram: (A) 0,1% TFA em água e (B) 100% acetonitrilo. O gradiente aplicado foi: 10% B até 3 min, 10 a 15% B 12 min, 15% B 5 min, 15 a 18% B 5 min, 18 a 30% B 20 min e 30 a 35% 5 min, a uma taxa de fluxo de 0.5 mL/min. Os solventes utilizados foram 0,1% ácido trifluoroacético (ATF) em água (A) e acetonitrilo (B). A eluição em modo gradiente seguiu os seguintes parâmetros: 10% B por 3 min, de 10 a 15% B por 12 min, 15% B por 5 min, de 15 a 18% B por 10 min, de 18 a 30% B por 20 min, de 30 a 35% B por 5 min e 35 a 10% B por 10 min. O tempo total de análise foi de 60 minutos, seguido do condicionamento da coluna durante 10 min, a um caudal de 0,5 mL/min. A detecção foi realizada com um detetor DAD, utilizando como o comprimento de onda principal 520 nm, e com espectroscopia de massa ligada em série através da saída da célula DAD. A detecção SM foi realizada em modo positivo utilizando um espectrômetro de massa Linear Ion Trap LTQ XL (Thermo Finnigan) equipado com uma fonte ESI. O azoto foi utilizado como gás de revestimento (50 psi); e o sistema foi operado com uma tensão de pulverização de 4,8 kV, uma temperatura da fonte de 320°C e uma tensão capilar de 14 V. O deslocamento da lente do tubo foi mantido a uma tensão de 75 V. O varrimento abrangeu uma amplitude de massa de m/z 100 a 1500. A energia de colisão utilizada foi de 20 (unidades arbitrárias). A aquisição de dados foi realizada com o sistema de dados Xcalibur® (Thermo Finnigan).

A caracterização das antocianinas presentes nas amostras foi obtida recorrendo ao seu espectro UV-Vis e de massa, sendo os seus tempos de retenção comparados com padrões, quando disponíveis. Para análise quantitativa, obtiveram-se as curvas de calibração por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas (0,25-50 µg/mL): cianidina-3-*O*-glucósido ( $y = 97787x - 743469$ ;  $R^2 = 0,9993$ ), peonidina ( $y = 110391x - 1E^{06}$ ;  $R^2 = 0,9991$ ) e pelargonidina-3-*O*-glucósido ( $y = 43781x - 275315$ ;  $R^2 = 0,9989$ ). Os resultados foram expressos em mg por g de extrato.

### **3.6. Avaliação das propriedades bioativas dos frutos de *Solanum melongena* L.: epicarpo, polpa e fruto inteiro, através de ensaios *in vitro***

*Preparação do extrato hidroetanólico.* A extração foi realizada de acordo com o descrito anteriormente na **secção 3.5.5.1**. O extrato liofilizado foi re-dissolvido em meio de cultura (10 mg/mL) para os ensaios atividade antimicrobiana (**secção 3.6.1.**), em água destilada numa concentração de 8 mg/mL para avaliação da atividade citotóxica (**secção 3.6.2.**), hepatotoxicidade (**secção 3.6.3.**) e atividade anti-inflamatória (**secção 3.6.4.**) e numa solução hidroetanólica (EtOH/H<sub>2</sub>O; 80:20) numa concentração de 5 mg/mL para avaliação da atividade antioxidante (**secção 3.6.5.**). Posteriormente, estas soluções foram diluídas sucessivamente de forma a obter as concentrações de trabalho.

#### **3.6.1. Análise da atividade antimicrobiana**

##### **3.6.1.1. Atividade antibacteriana**

Para avaliação da atividade antibacteriana seguiu-se a metodologia descrita anteriormente por Carochó et al. (2015). Utilizaram-se bactérias Gram-negativo como: *Enterobacter cloacae* (ATCC - American type culture collection 35030), *Escherichia coli* (ATCC 35210) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) e bactérias Gram-positivo *Listeria monocytogenes* (NCTC – National collection of type cultures 7973) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Estes microrganismos foram adquiridos no Laboratório de Micologia do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Investigação Biológica “Siniša Stanković” da Universidade de Belgrado na Sérvia. A concentração mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB), para cada um dos extratos avaliados, foi determinada usando o método de microdiluição.

As culturas de bactérias foram ajustadas através do espectrofotómetro ficando com uma concentração de  $1 \times 10^5$  CFU/mL, correspondendo a uma suspensão bacteriana determinada num espectrofotómetro a 625 nm. As diluições de inóculos foram cultivadas em meio sólido para verificar a ausência de contaminação e verificar a validade do inóculo. As diferentes diluições do extrato hidroetanólico foram pipetadas para os poços contendo 100 µL de caldo de soja tríptico (TSB) e, posteriormente, foram adicionados 10 µL de inóculo. As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Para a determinação das CMIs (concentração mínima inibitória; menor concentração que produziu uma inibição significativa (em torno de 50%) do crescimento da

bactéria em comparação com o controle positivo) foram adicionados 40 µL de cloreto de iodonitrotetrazólio (INT) (0,2 mg/mL) e incubou-se a 37 °C durante 30 min. As CMI's obtidas do teste de suscetibilidade de várias bactérias ao extrato foram determinadas também por um ensaio colorimétrico de viabilidade microbiana baseado na redução da cor INT e comparado com um controle positivo para cada estirpe bacteriana. A CMB (concentração mínima bactericida) foi determinada por subcultura em série, colocando 10 µL de cada poço que não apresentou mudança de cor a 100 µL de TSB. A menor concentração que não apresentou crescimento após essa subcultura foi considerada como a CMB. A estreptomicina e a ampicilina foram usadas como controles positivos, enquanto 5 % de dimetilsulfóxido (DMSO) foi usado como controle negativo. Os resultados de CMI e CMB foram expressos em mg/mL de extrato hidroetanólico liofilizado.

#### **3.6.1.2. Atividade antifúngica**

Para a avaliação da atividade antifúngica foi seguido o procedimento descrito anteriormente por Carochó et al. (2015). Para tal, foram utilizados os microfungos *Aspergillus fumigatus* (ATCC 1022), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *Penicillium ochrochloron* (ATCC 9112) e *Trichoderma viride* (IAM 5061). Estes organismos foram adquiridos no Laboratório de Micologia do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Investigação Biológica “Siniša Stanković” na Universidade de Belgrado na Sérvia.

Os micromicetos foram mantidos em malte ágar (MA) e as culturas foram armazenadas a 4 °C e sub-cultivadas uma vez por mês. Os esporos fúngicos foram lavados da superfície das placas de ágar com solução salina estéril a 0,85 % contendo Tween 80 a 0,1 % (v/v). A suspensão de esporos foi ajustada com uma solução salina estéril para uma concentração de aproximadamente  $1,0 \times 10^5$  num volume final de 100 µL por poço. Os inóculos foram armazenados a 4 °C. As diluições dos inóculos foram cultivadas em MA sólido para verificar a ausência de contaminação e a validade do inóculo. A determinação da CMI foi realizada pela técnica de diluição sucessivas em microplacas de 96 poços. A amostra foi adicionada ao meio de malte com o inóculo fúngico e as microplacas foram incubadas durante 72 horas a 28 °C. As concentrações mais baixas sem crescimento visível (usando um microscópio binocular) foram definidas como CMI. As concentrações mínimas fúngidas (CMFs) foram determinadas por subcultura em série de 2 µL

de cada poço que não apresentou mudança de cor, em microplacas contendo 100 µL de caldo de malte por poço e posterior incubadas durante 72h a 28 °C. A menor concentração sem crescimento visível foi definida como CMF, indicando 99,5% de morte do inóculo original. O DMSO a 5% foi utilizado como controlo negativo, enquanto o bifonazol e o cetoconazol foram utilizados como controlos positivos. Os resultados de CMI e CMF foram expressos em mg/mL de extrato hidroetanólicos.

### **3.6.2. Avaliação da citotoxicidade em linhas celulares tumorais**

A avaliação do potencial citotóxico do extrato hidroetanólico (80:20, v/v) do fruto de *S. melongena* (fruto inteiro, polpa e epicarpo) foi realizada através do ensaio da Sulforodamina B (SRB), previamente descrito por Barros et al. (2013) (**Figura 7**).

Para testar a capacidade anti-proliferativa do extrato em células tumorais, foram usadas várias linhas celulares tumorais humanas, tais como: MCF-7 (carcinoma da mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular); obtidas no DMSMZ – Leibniz – Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Estas linhas foram mantidas como culturas aderentes em meio RPMI-1640 suplementado com 10 % FBS (MCF-7 e NCI-H460) ou em DMEM suplementado com 10 % FBS, 2 mM glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (células HeLa e HepG2), a 37 °C numa incubadora com ar humidificado e 5% CO<sub>2</sub>.

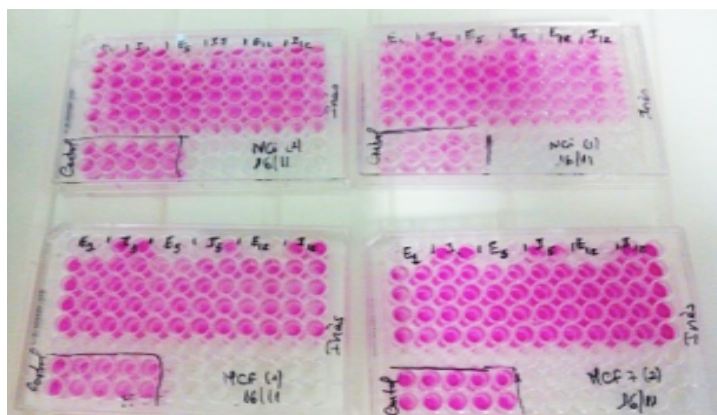
Todos os procedimentos foram realizados em ambiente asséptico e em câmara de fluxo laminar (TLStar, AV-30/70), a fim de evitar contaminações. Foram testadas concentrações de 0,125 a 8 mg/mL, através da diluição em água. As células foram mantidas em meio RPMI-1640 contendo 10% de Soro Fetal de Bovino (SFB) inativado pelo calor (MCF-7 e NCI-H460) ou em DMEM suplementado com 10% SFB, 2 mM glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (células HeLa e HepG2), numa incubadora com condições estabelecidas de 37 °C, ar humidificado e 5% CO<sub>2</sub> (HF 151, Heal Force).

Em primeiro lugar, retirou-se o meio de cultura de cada caixa que continha as linhas celulares e adicionou-se o meio de lavagem (HBSS, 2 mL). Seguidamente, adicionou-se a enzima proteolítica tripsina (1,5 mL) e colocou-se na incubadora durante 3 minutos, com o intuito das células descolarem. Após 3 minutos, adicionou-se meio de cultura (3 mL) para inativar a tripsina

evitando, desta forma, a destruição celular. A suspensão celular obtida foi pipetada e transferida para um falcon estéril para centrifugar a 1200 rpm, 5 min, T=10 °C (Centurion K24OR, West Sussex, Reino Unido).

Seguidamente, rejeitou-se o sobrenadante e suspendeu-se o pellet em 5 mL de meio de cultura. Desta, retiraram-se 50 µL de suspensão, à qual se adicionou 50 µL de solução de azul tripano, homogeneizando de seguida, para a contagem do número de células numa câmara de Neubauer. Neste seguimento, cada linha celular foi plaqueada numa densidade apropriada ( $1.0 \times 10^4$  células/poço), de acordo com os cálculos efetuados, em placas de 96 poços. Obtiveram-se 6 diluições distintas da amostra (10 µL, 400 – 6,25 µg/mL) em cada poço, juntamente com o volume de células referido anteriormente, perfazendo-se o volume de cada poço com meio de cultura. As microplacas foram seladas e guardadas na incubadora durante 24h até ao teste da SRB. Após tal período de incubação, adicionou-se a cada poço ácido tricloroacético frio (TCA, 10%; 100 µL), incubando-se de seguida durante 60 min a 4 °C. As microplacas foram lavadas com água desionizada e secas. De seguida, adicionou-se solução de SRB (0,1% em 1% ácido acético; 100 µL), ficando a placa a incubar durante 30 min à temperatura ambiente.

Posteriormente, lavou-se a placa com ácido acético (1%) para remover o excesso de SRB e deixou-se secar ao ar. A SRB foi solubilizada com 200 µL de Tris (10 mM; pH 7,4) num agitador de microplacas (Stat Fax-2100). A absorvância foi medida a 540 nm num leitor de microplacas (Instrumentos Bio-Tek, ELX800, Inc; Winooski, EUA), utilizando-se a elipticina como controlo positivo. Os resultados foram expressos em valores de GI<sub>50</sub> (concentração de amostra que inibe 50% de crescimento celular) em unidades de µg/mL.



**Figura 7.** Ensaio de avaliação citotóxica em linhas celulares tumorais (Fonte: do autor).

### **3.6.3. Avaliação da hepatotoxicidade numa cultura celular primária não tumoral**

Para o ensaio da avaliação da hepatotoxicidade foi utilizado fígado de porco, obtido num matadouro local, de forma a obter uma cultura celular não tumoral designada por PLP2 (cultura primária de células de fígado de porco). O tecido de fígado foi lavado com solução Hank's contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e dividido em explantes de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>. Alguns destes explantes foram colocados em frascos de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio DMEM suplementado com FBS (10%), aminoácidos não essenciais (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Os frascos foram incubados a 37 °C com atmosfera humidificada e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio foi substituído a cada dois dias de incubação e o crescimento celular foi monitorizado por observação com um microscópio de contraste de fase.

Foram transferidos para microplacas de 96 poços 190 µL da cultura celular com densidade adequada (1,0x10<sup>4</sup> células/poço), juntamente com 10 µL das diferentes diluições do extrato, mencionado na **secção 3.6.2.** (400 a 6,25 µg/mL), incubando-se a 37 °C por 48 horas. Em seguida, efetuou-se o ensaio SRB anteriormente descrito (**secção 3.6.2.**). A elipticina foi utilizada como controlo positivo e os resultados foram expressos em GI<sub>50</sub> (concentração de amostra que inibe 50% de crescimento celular em cultura de células PLP2) em unidades de µg/mL (Barros et al., 2013).

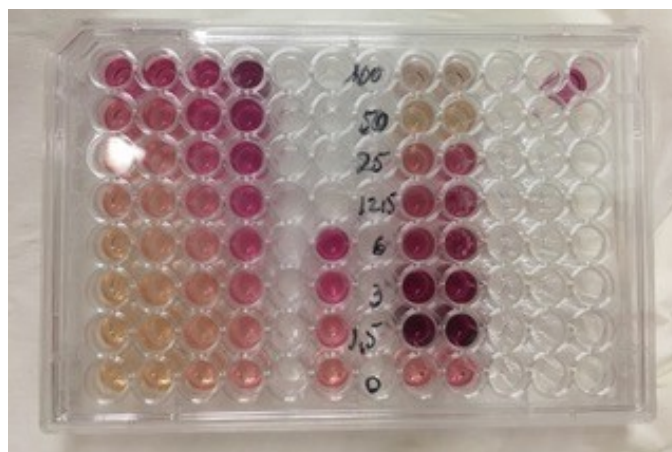
### **3.6.4. Avaliação da atividade anti-inflamatória**

Para a avaliação da atividade anti-inflamatória (**Figura 8**) foram usadas células macrófagas RAW 264.7 de rato, de acordo com o procedimento de Jabeur et al. (2016). Foram feitas culturas de células em meio DMEM, suplementado com 10% de soro bovino inativado por calor e L-glutamina, a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, em ar humidificado.

As células com crescimento ativo foram soltas com um raspador de células, a densidade experimental das células foi estabelecida a 5 × 10<sup>5</sup> células/mL e a proporção de células mortas foi inferior a 1%, de acordo com o teste de exclusão de Azul de Trypan. Seguidamente, as células foram distribuídas numa placa de 96 poços (150000 células/poço) e deixadas a aderir à microplaca durante a noite.

Posteriormente, as células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato do fruto de *S. melongena* (fruto inteiro, polpa e epicarpo) durante 1 hora, seguido de estimulações com lipopolisacáridos (LPS) (1 µg/mL) ao longo de 18 horas. Foram preparados controlos sem a adição de LPS de forma a observar se estes induziam alterações nos níveis basais de óxido nítrico (NO).

A presença de óxido nítrico foi determinada utilizando um Kit de Reagentes Griess (Promega) que contem sulfanilamida, hidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) e soluções nitradas. O sobrenadante das células (100 µL) foi transferido para a placa e misturado com sulfanilamida e solução NED, 5 a 10 minutos cada, à temperatura ambiente. O óxido nítrico produzido foi determinado medindo a absorvância a 540 nm (leitor de microplacas ELX800 Biotek) e comparado com a curva de calibração (Jabeur et al., 2016).



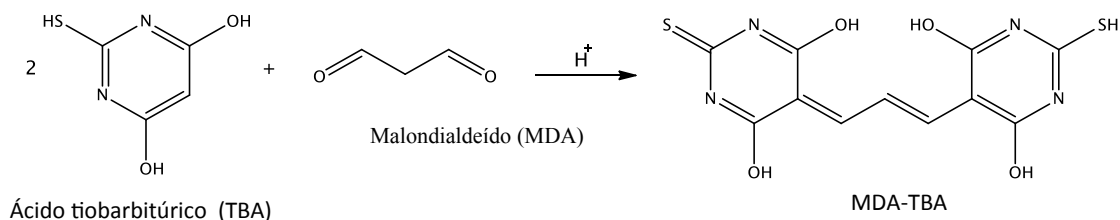
**Figura 8.** Ensaio de avaliação da atividade inflamatória (Fonte: Fernandes, 2018).

### 3.6.5. Avaliação da atividade antioxidante

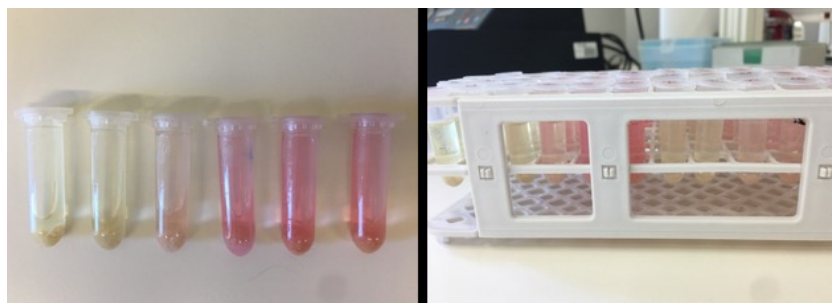
#### 3.6.5.1. TBARS

A peroxidação lipídica pode ser determinada pelos produtos da oxidação que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA), dando origem a compostos rosa que são conhecidos como espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS – “thiobarbituric acid reactive species”). Um dos produtos comumente usados como biomarcador de peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA) que se associa ao TBA na presença de íons  $H^+$  para formar um cromógeno (MDA-TBA) de acordo com a reação mostrada na **Figura 9**. Nesta metodologia (**Figura 10**), a oxidação de uma preparação rica em lipídios é induzida pela adição de um íão metálico (ferro ou cobre), e a extensão da reação

com o ácido tiobarbitúrico é determinada pela capacidade dos antioxidantes presentes na amostra em pararem o processo de oxidação, inibindo assim a formação do cromógeno (menos rosa) (Gutteridge, 1995; Ng et al., 2000).



**Figura 9.** Formação do complexo MDA-TBA.



**Figura 10.** Ensaio de avaliação da atividade antioxidante (Fonte: José Pinela, CIMO).

Cérebros de porco, obtidos num matadouro local, foram dissecados e homogeneizados com um Polytron em tampão Tris-HCl gelado (20 mM, pH 7,4), para produzir um homogenato de tecido cerebral 1:2 (*p/v*) que foi centrifugado a 3000 g por 10 min. Uma alíquota (0,1 mL) do sobrenadante foi incubada com as diferentes concentrações da solução (0,2 mL) na presença de FeSO<sub>4</sub> (10 μM; 0,1 mL) e ácido ascórbico (0,1 mM; 0,1 mL) a 37 °C por 1 h. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (28% *p/v*, 0,5 mL), seguido por ácido tiobarbitúrico (TBA, 2%, *p/v*, 0,38 mL), e a mistura foi então aquecida a 80 °C por 20 minutos. Após centrifugação a 3000 g durante 10 minutos para remover a proteína precipitada, a intensidade da cor do complexo MDA-TBA no sobrenadante foi medido pela sua absorbância a 532 nm. A taxa de inibição (%) foi calculada usando a **Equação 3**.

$$\text{Taxa de inibição (\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

**Equação 3.** Equação da determinação da taxa de inibição em ensaio TBARS.

Onde:

A: absorbância do controle

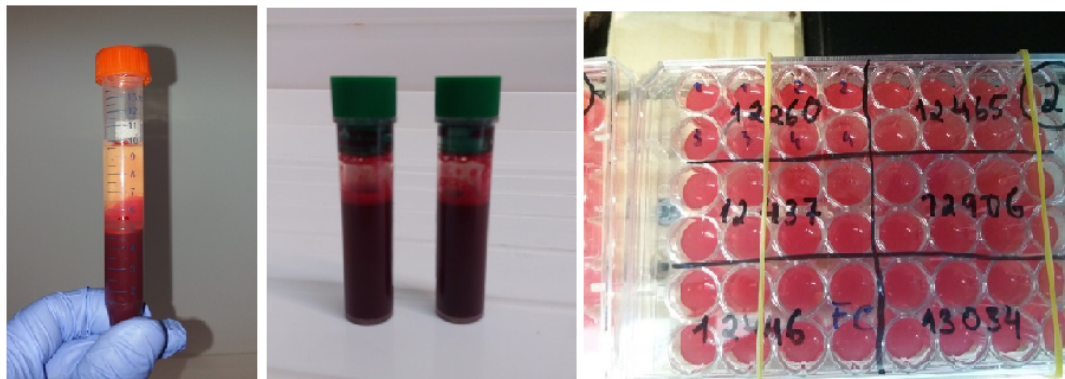
B: absorbância da solução do composto

### 3.6.5.2. OxHLIA

Para a realização deste método, foi recolhido sangue de ovelha. A amostra de sangue foi centrifugada (Multifuge X1R, Thermo Fisher Scientific; 2900 rpm, 5 min, 10 °C) e o sobrenadante foi descartado para recuperar apenas os eritrócitos. Estes foram submetidos a uma primeira lavagem com NaCl (150 mM) seguido por três lavagens com tampão fosfato-salino (PBS; pH 7,4), com centrifugação e remoção do sobrenadante em cada lavagem (Evans et al., 2013). Uma solução de eritrócitos a 2,8% foi preparada (v/v), ressuspendendo em PBS. Em microplacas de 48 poços foi adicionado 200µL da solução eritrocitária a 400 µL de PBS (controle), de água (hemólise completa) ou extrato das diferentes amostras de beringela dissolvido em PBS (20 a 0,625 mg/mL). As microplacas foram pré-incubadas com agitação (37 °C, 10 min) para mais uma adição de 200 ul de di-hidroclorato de 2,2'-azobis (2-amidinopropan) (AAPH; 160 mM). Após a medição da densidade óptica em 690 nm, as microplacas foram novamente incubadas sob as mesmas condições, com medições a cada 10 minutos (Takebayashi et al., 2012). A percentagem da população de eritrócitos que permaneceu intacta (PE) foi calculada com a **Equação 4**. A **Figura 11** mostra algumas etapas do procedimento experimental.

$$PE(\%) = \left( \frac{S_t - CH_0}{S_0 - CH_0} \right) \times 100$$

**Equação 4.** Percentagem da população de eritrócitos (PE) no ensaio OXHLIA.



**Figura 11.** Ensaio experimental OxHLIA (Fonte: José Pinela, CIMO).

Onde  $S_t$  e  $S_0$  correspondem à densidade óptica da amostra em  $t$  e 0 min, respetivamente, e  $CH_0$  é a densidade óptica da hemólise completa em 0 min. Os resultados foram expressos como tempo de atraso da hemólise ( $\Delta t$ ), calculado com a **Equação 5**.

$$\Delta t(\text{min}) = H_{t50}(\text{amostra}) - H_{t50}(\text{controlo})$$

**Equação 5.** Tempo de atraso da hemólise.

Onde  $H_{t50}$  é o tempo correspondente a 50% de hemólise (min) obtido graficamente a partir da curva de hemólise para cada concentração de amostra antioxidante. Posteriormente, correlações lineares foram estabelecidas entre os valores de  $\Delta t$  e as diferentes concentrações da amostra (Lockowandt et al., 2019). Destes, a concentração capaz de retardar a hemólise foi calculada em 60 min ( $EC_{50}$  (60 min), mg/mL) e 120 min ( $EC_{50}$  (120 min), mg/mL).

### **3.7. Otimização do processo de extração para obtenção de um corante natural à base de antocianinas, a partir do epicarpo dos frutos de *Solanum melongena* L.**

O processo industrial de obtenção de extratos naturais com potencial corante é amplamente utilizado e consiste, principalmente, na aplicação da técnica de maceração recorrendo a misturas de solventes com água, seguido de outras etapas. No entanto, este processo convencional que tem

sido usado em grande escala, apresenta algumas desvantagens, tais como: altos gastos de energia e longos tempos de extração (Wang et al., 2016; Zhu et al., 2016).

Como técnica alternativa, surge a extração assistida por ultrassons adequando-se, de forma mais eficaz, à extração de compostos fitoquímicos. Esta técnica consiste na quebra das paredes celulares da matriz causada pelos efeitos da cavitação, produzindo um aumento da área de contacto entre o sólido e o solvente. Tendo em conta as técnicas convencionais, a extração assistida por ultrassons destaca-se por possuir inúmeras vantagens, nomeadamente, o facto de ser energeticamente menos exigente, ter menor consumo de solvente e, em geral, produzir extratos com rendimentos de pureza mais altos (López, 2017).

Assim, para a realização da otimização da extração dos compostos antociânicos, a partir do epicarpo da beringela, foi utilizada a extração assistida por ultrassons e desenvolvido um desenho experimental chamado desenho composto central circunscrito (DCCC), aplicando-se a metodologia de superfície de resposta (RSM), a fim de simplificar e reduzir os custos operacionais do processo, diminuir os tempos do processo de extração e, reduzir a energia despendida bem como o consumo de solvente (Zhu et al., 2016; Roriz et al., 2017).

Contudo, para a obtenção de um extrato rico em antocianinas, foi essencial considerar vários fatores que afetam a sua estabilidade, entre os quais, pH, temperatura, luminosidade, níveis de oxigênio presentes, e solventes utilizados na extração, além dos inúmeros fatores que geram discrepâncias entre matrizes naturais (Montesano et al., 2008; Rodriguez-Amaya, 2016). Neste contexto, para se alcançar uma máxima eficiência de extração, é imprescindível proceder a uma avaliação das condições ótimas para cada variável envolvida (Jiménez et al., 2018).

Recorrendo à metodologia RSM é possível otimizar vários fatores (tempo, percentagem de solvente e potência aplicada) de forma simultânea, obtendo-se modelos gráficos e equações polinomiais que permitem descrever as condições ideais que maximizam os critérios de resposta (Roriz et al., 2017).

### **3.7.1. Desenho experimental e procedimento de extração assistida por ultrassons**

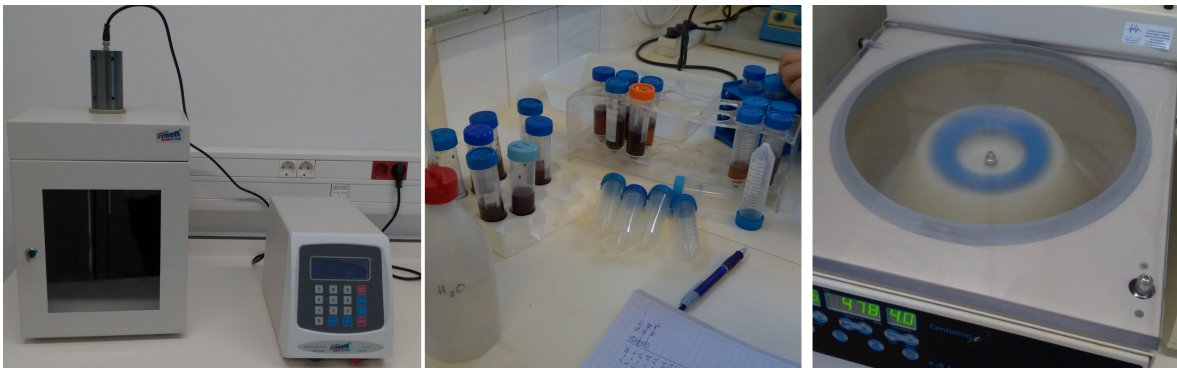
Foram realizados ensaios baseados na análise individual das variáveis e foram selecionadas aquelas que causaram efeitos significativos juntamente com os intervalos relevantes (**Tabela 5**).

Os efeitos das três variáveis definidas foram estudados utilizando um desenho composto central circunscrito (*DCCC*), associado a cinco níveis (Heleno et al., 2016), o qual gerou 20 combinações de respostas, realizadas com o intuito de obter uma maior capacidade preditiva do modelo.

O procedimento de extração (**Figura 12**) foi realizado como descrito anteriormente por López (2017), através de um equipamento de ultrassons (sonicadores QSonica, modelo CL-334, Newtown, Connecticut, EE.UU). As amostras foram extraídas com 25 mL de solvente (acidificado com ácido cítrico a 0,05%). Neste caso as variáveis e seus intervalos foram: tempo (t ou  $X_1$  0.5 a 5.5 min), o solvente de extração etanol/água ( $X_2$  8% a 92%), e a razão solido líquido ( $X_3$  5 a 65 g/L), enquanto a temperatura foi controlada pelo equipamento para permanecer abaixo de 30 °C.

**Tabela 5.** Delineamento experimental e codificação das variáveis independentes usadas no desenho fatorial *DCCC* com 5 níveis.

Extração	Tempo (min)	Solvente (%)	Razão (g/L)
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	1,68	0	0
10	-1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0



**Figura 12.** Procedimento experimental da extração assistida por ultrassons (Fonte: do autor).

### 3.7.2. Preparação dos extratos obtidos pela extração assistida por ultrassons

Após o procedimento de cada extração acima referida, as amostras foram centrifugadas (5000 *rpm*; durante 20 min a 10 °C) e, para remoção dos sólidos em suspensão, foram filtradas através de papel de filtro (Whatman nº 4). O sobrenadante foi recolhido e dividido em duas frações: uma para análise em HPLC-DAD e a segunda para determinação do rendimento da extração. A fração separada para análise em HPLC (2 mL) foi filtrada através de filtro de seringa LC (0,22 µm) e, de seguida injetada; a segunda fração, utilizada para determinação do rendimento de extração (5 mL) foi submetida a secagem com uma temperatura de 105 °C durante 48 horas, para posterior pesagem do extrato sólido.

### 3.7.3. Identificação e quantificação dos compostos antociânicos por HPLC-DAD

Os extratos obtidos no processo anterior foram analisados utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Dionex UltiMate 3000 UPLC, Thermo Scientific), tal como descrito na *secção 3.5.5.1*.

A antocianina presente na amostra foi caracterizada de acordo com os seu espectro UV-Vis e massa e tempo de retenção em comparação com a identificação obtida na *secção 3.5.5.2*. A análise quantitativa do composto antociânico foi obtida através de curva de calibração com a injeção de um padrão de concentrações conhecidas (200-0,25 µg/mL) do composto cianidina-3-*O*-glucósido ( $y = 97787x - 743469$ ;  $R^2 = 0,9993$ ).

### 3.7.4. Formato de resposta utilizada para processos analíticos

O rendimento (%) e o teor do composto antociânico detetado na **secção 3.7.3.** (A) foram utilizados como respostas. A expressão dos resultados recaiu sobre dois formatos de resposta (Y):  $Y_1$ : mg de antocianinas por grama de amostra seca (mg/g ms);  $Y_2$ : mg de antocininas por grama de resíduo extraído (mg/g ext), que foi usado para avaliar a pureza das antocianinas nos extratos e  $Y_3$ : quantidade de resíduo extraído expresso em *Rendimento* (%).

### 3.7.5. Análise do modelo matemático e avaliação estatística

#### 3.7.5.1. Modelo matemático

Os dados de RSM foram ajustados através do cálculo dos mínimos quadrados, usando a equação polinomial de segunda ordem com termos de interação complexos (**Equação 6**):

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

**Equação 6.** Equação polinomial de segunda ordem usada no modelo matemático.

Para a qual:

Y - variável dependente (variável de resposta) a ser modelada,

$X_i$  e  $X_j$  - variáveis independentes,

$b_0$  - coeficiente constante,

$b_i$  - coeficiente que descreve o efeito linear individual de cada variável,

$b_{ij}$  - coeficiente responsável por descrever os mecanismos interativos lineares entre 2 variáveis,

$b_{ii}$  - coeficiente responsável pelo efeito quadrático de cada variável,

n - número total de variáveis.

Como respostas (Y) foram aplicados o rendimento de extração (Rendimento, %) e o teor (mg A/g E) da antocianina detetada (A).

#### 3.7.5.2. Procedimento para otimização das variáveis

Com o objetivo de otimizar o modelo de previsão e, conseqüentemente, maximizar o rendimento da extração, recorreu-se a um método simplex, o qual permite resolver problemas não

lineares (Vieira et al., 2017). Para evitar variáveis com condições físicas não naturais e irrealistas, foram impostas algumas limitações às variáveis codificadas (nomeadamente  $t \geq 0$ ;  $0 < S < 100$ ).

### 3.7.5.3. Métodos numéricos, análise estatística e ilustrações gráficas

Os procedimentos de ajuste, as estimativas de coeficientes e os cálculos estatísticos dos resultados experimentais foram realizados de acordo com um procedimento anteriormente descrito por Prieto & Vázquez (2014). De uma forma breve:

a) para a determinação dos coeficientes, recorreu-se ao algoritmo não linear quasi-Newton (mínimos quadrados), através da Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies, Inc. Warrenton, VA, USA) e Design expert 12.0.1. (Stat-Ease, Inc. Minneapolis, MN, USA) software, para minimizar as diferenças entre os valores obtidos e os valores previstos pelo modelo;

b) a significância dos coeficientes foi avaliada através da ANOVA realizado no Design expert 12.0.1, com o intuito de determinar os seus intervalos ( $\alpha = 0,05$ );

c) a consistência do modelo foi comprovada através de vários critérios estatísticos aplicados: i) o F-teste de Fisher ( $\alpha = 0,05$ ) foi utilizado para avaliar o ajuste do modelo aos dados observados; ii) Durbin-Watson ( $\alpha = 0,05$ ) foi utilizado; iii) o  $R^2$  foi interpretado como a proporção de dados explicados pelo modelo.

### 3.8. Preparação do extrato ótimo rico em antocianinas a partir do epicarpo do fruto de *Solanum melongena* L.

Após a realização dos estudos de otimização relativamente ao processo de extração, para a obtenção de um extrato rico em antocianinas, foi realizada uma extração assistida por ultrassons, a partir do epicarpo dos frutos de *S. melongena*, aplicando os valores ótimos, das variáveis utilizadas, obtidos na **secção 3.7.1**.

A amostra foi colocada juntamente com solvente etanol/água (55:45; v/v) acidificado com 0,05% de ácido cítrico (até obtenção de pH = 3), num frasco de vidro com tampa, na proporção de 5 g/L. A extração seguiu condições estabelecidas de tempo (5,5 minutos). Após o procedimento descrito, as amostras foram centrifugadas (Centurion K24OR, West Sussex, Reino Unido) a 5000 rpm, durante 5 min a 10 °C e filtradas através de papel filtro (Whatman nº 4). O sobrenadante foi

evaporado num evaporador rotativo a 35 °C (Büchi R-210, Flawil, Suíça) de forma a remover a fração etanólica. Por fim, a fração aquosa obtida foi liofilizada (FreeZone 4.5, Labconco) obtendo-se um extrato pigmentado.

### **3.9. Análise estatística**

Os ensaios descritos foram realizados em triplicado e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (SD). Os dados para a avaliação fruto de *S. melongena* no que concerne aos parâmetros da cor, parâmetros nutricionais, composição química, potencial bioativo e otimização da extração de antocianinas, foram analisados através da aplicação de diferentes testes estatísticos. O teste *t*-student, foi aplicado com o intuito de determinar as diferenças significativas entre 2 tipos de amostras distintas de beringela (fruto inteiro e polpa); de outro modo, a análise estatística para a avaliação dos resultados dos 3 tipos distintos de beringela (epicarpo, fruto inteiro e polpa), foi realizada através da aplicação de uma análise de variância one way (ANOVA), com *p*-value = 0,05 (SPSS v. 23.0; IBM Corp., Armonk, Nova Iorque, EUA).

O tratamento estatístico para os ensaios descritos de otimização do processo de extração para obtenção de um extrato rico em antocianinas, foram analisados através de uma ANOVA usando o software Design-Expert 12.0.1 e Statgraphics.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Avaliação da cor do epicarpo, polpa e fruto inteiro de *S. melongena*

A cor representa um dos parâmetros mais importantes na escolha dos alimentos por parte dos consumidores. Para além disso, a coloração de um alimento é um indicador da presença de vários compostos de interesse, sendo no caso particular do epicarpo da beringela, a presença de antocianinas. A análise cromática no espaço de cor CIE  $L^* a^* b^*$  foi realizada no epicarpo fresco e liofilizado de beringela e os resultados estão presentes na **Tabela 6**.

A escala de luminosidade representada pelo parâmetro  $L^*$  varia entre 0 e 100, e os parâmetros  $a^*$  (verde ao vermelho) e  $b^*$  (azul ao amarelo) variam entre -120 e 120 (Xu et al., 2016). Na avaliação da cor do epicarpo fresco para os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$ , e  $b^*$  foram obtidos valores médios de:  $26,2 \pm 0,5$ ;  $5,1 \pm 0,2$  e  $1,5 \pm 0,1$ , respetivamente. Por outro lado, no epicarpo de beringela liofilizado o parâmetro  $L^*$  evidenciou um valor de  $33,77 \pm 1,84$ , e os valores nos parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  foram de  $2,75 \pm 0,13$  e  $-0,17 \pm 0,01$ , respetivamente. Os respetivos valores CIE foram convertidos em valores RGB através de um programa (<<http://www.easyrgb.com/en/convert.php>>), onde se pode visualizar as diferentes tonalidades do epicarpo.

**Tabela 6.** Parâmetros físicos (cor - CIE  $L^* a^* b^*$ ) do epicarpo do fruto de *Solanum melongena* L. fresco e liofilizado (média  $\pm$  DP).

Parâmetros de avaliação da cor	Epicarpo fresco	Epicarpo liofilizado	<i>p</i> -value
$L^*$	$26,2 \pm 0,5$	$33,77 \pm 1,84$	<0,01
$a^*$	$5,1 \pm 0,2$	$2,75 \pm 0,13$	<0,01
$b^*$	$1,5 \pm 0,1$	$-0,17 \pm 0,01$	<0,01
Cor do epicarpo			

$L^*$ - luminosidade;  $a^*$  eixo cromático de verde (-) a vermelho (+);  $b^*$ , eixo cromático de azul (-) a amarelo (+). As diferenças estatísticas das médias foram obtidas através do teste de *t*-student.

Através da análise estatística dos resultados verificou-se que o processo de desidratação (por liofilização) do epicarpo da beringela teve influência significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os parâmetros de cor avaliados. O parâmetro  $L^*$  possui valores inferiores no epicarpo fresco, indicando uma tonalidade mais clara, quando comparado com a amostra liofilizada.

Contrariamente, o parâmetro  $a^*$  apresentou valores mais elevados no epicarpo fresco, mostrando uma coloração mais próxima da tonalidade vermelha. O mesmo decréscimo, após liofilização, foi verificado no parâmetro  $b^*$ , que revelou que o epicarpo liofilizado apresenta uma tonalidade mais aproximada da cor azul.

De acordo com vários resultados disponíveis na literatura, é possível constatar que os distintos processos de desidratação aplicados podem modificar as propriedades físico-químicas dos frutos (Russo et al., 2013).

No presente estudo, foi evidente que o processo de liofilização levou à diminuição da cor púrpura do epicarpo. Este comportamento pode estar associado à degradação de antocianinas presentes na amostra, verificado, principalmente, pela diminuição do valor apresentado no parâmetro  $a^*$  (Jiang et al., 2018). Outros autores, que também estudaram este processo, (Lao e Giusti, 2017; Weber et al., 2017; Nemzer et al., 2018) demonstraram que a alteração da cor após processos de desidratação está associada à degradação dos pigmentos antocianicos.

Neste sentido, o processo de desidratação aplicado deve ser adequado, de forma a preservar ao máximo as características físico-químicas originais das amostras. Uma das metodologias que demonstra menor degradação associada é o processo de liofilização (Lima-Corrêa et al., 2017).

Badulescu et al. (2019) estudaram o efeito da desidratação por liofilização e secagem por calor no teor em antocianinas, em framboesas. Os resultados mostraram que o processo de liofilização foi mais eficiente em preservar os compostos antocianicos da amostra, devido à ausência de temperatura no processo, o que contribui para evitar a deterioração.

Também Nemzer et al. (2018), realizaram um estudo onde foram comparados os efeitos de diferentes métodos de desidratação (secagem por calor, liofilização e secagem por janela de refractância) nas cores de frutos de mirtilo, cereja, morango e arando. Os autores usaram como controlo o método de congelamento rápido individualizado (IQF: *individually quick frozen*) e observaram que a metodologia de secagem por liofilização e secagem por janela de refractância (RWD: *refractance window drying*), foram as técnicas onde se verificaram menos alterações na coloração das amostras, possivelmente por provocarem menor destruição de antocianinas. Foi também evidente que a secagem por ar quente resultou em maior variação na cor, devido a vários fatores, nomeadamente à oxidação do pigmento por elevada exposição a oxigénio e decomposição do pigmento devido à aplicação de altas temperaturas no processo.

#### 4.2. Caracterização nutricional do fruto da beringela (inteiro e polpa)

Os resultados obtidos na caracterização nutricional do fruto inteiro e da polpa de *Solanum melongena* L. estão presentes na **Tabela 7**.

O teor de humidade apresentou valores de  $91,3 \pm 0,3$  g/100g mf para as amostras do fruto inteiro e  $92,7 \pm 0,2$  g/100g mf para as amostras da polpa, indicando uma elevada percentagem de água na sua composição. Por outro lado, foram evidentes teores consideravelmente mais baixos nos restantes nutrientes e não nutrientes avaliados nestas amostras. Na avaliação do teor em hidratos de carbono obtiveram-se valores de  $7,2 \pm 0,2$  g/100 g mf para o fruto inteiro e  $6,0 \pm 0,1$  g/100 g mf para a polpa; no teor em gordura foram obtidas concentrações mais baixas, oscilando entre  $0,050 \pm 0,002$  g/100 g mf (fruto inteiro) e  $0,040 \pm 0,001$  g/100 g mf (polpa); a concentração em proteínas foi de  $0,86 \pm 0,02$  g/100 g mf (fruto inteiro) e  $0,78 \pm 0,03$  g/100 g mf (polpa) e, por fim, o teor em cinzas foi de  $0,56 \pm 0,01$  g/100 g mf e  $0,56 \pm 0,02$  g/100 g mf para o fruto inteiro e para a polpa, respectivamente. O valor energético revelou concentrações satisfatórias, com concentrações de  $32,6 \pm 1,1$  kcal/100g mf no fruto inteiro e  $27,5 \pm 0,6$  kcal/100g mf polpa. Os valores obtidos no presente estudo explicam o elevado interesse no consumo deste alimento, nomeadamente, em dietas com restrição calórica.

Através da análise estatística, foi evidente a ausência de variação significativa ( $p > 0,05$ ) na maioria dos parâmetros testados (humidade, cinzas, proteínas, hidratos de carbono e energia), com exceção do teor em gordura que apresentou uma oscilação significativa ( $p < 0,05$ ), sendo mais elevado nas amostras de beringela inteira.

**Tabela 7.** Parâmetros nutricionais do fruto de *Solanum melongena* L. (média  $\pm$  DP).

Valor nutricional	Fruto inteiro	Polpa	<i>p</i> -value
Humidade (g/100 g mf)	$91,35 \pm 0,03$	$92,73 \pm 0,02$	0,944
Cinzas (g/100 g mf)	$0,56 \pm 0,01$	$0,56 \pm 0,02$	0,862
Proteínas (g/100 g mf)	$0,86 \pm 0,02$	$0,78 \pm 0,03$	0,729
Gordura (g/100 g mf)	$0,049 \pm 0,002$	$0,040 \pm 0,001$	<0,01
Hidratos de carbono (g/100 g mf)	$7,2 \pm 0,2$	$5,9 \pm 0,2$	0,893
Energia (kcal/100 g mf)	$32,6 \pm 1,1$	$27,5 \pm 0,6$	0,869
Energia (Kj/100 g mf)	$136,64 \pm 4,490$	$115,09 \pm 2,350$	0,869

mf - massa fresca. As diferenças estatísticas das médias foram obtidas através do teste de *t*-student.

Relativamente aos dados disponíveis na literatura, os valores nutricionais do fruto inteiro da beringela apresentados no relatório 11209, divulgado pelo United States Department of Agriculture, revelaram concentrações aproximadas comparativamente com o presente estudo, nomeadamente, no teor de humidade (92,3 g/100g mf), no teor em cinzas (0,66g/ 100g mf) e no teor em proteínas (0,98g/100g mf). Contudo, os restantes macronutrientes apresentaram valores discordantes, como é o caso do teor em gordura e hidratos de carbono com valores de 0,18 g/ 100g mf e 5,88 g/100g mf, respetivamente; enquanto a quantidade de energia apresentada pelo USDA foi de 25 kcal/100g mf.

Kandoliya et al. (2015) estudaram a composição de seis variedades de beringela e verificaram que o teor de humidade obtido na polpa foi de 91,1 a  $93 \pm 0,6$  %, enquanto o teor de proteínas foi de 0,66 a  $1,28 \pm 0,05$  %, estando estas concentrações em concordância com os valores obtidos no presente estudo.

De outro modo, Agoreyo et al. (2012) avaliaram nutricionalmente duas variedades de *Solanum melongena* (redonda e oval) não amadurecidas. Os resultados obtidos revelaram teores de humidade de  $78,4 \pm 0,49$  % e  $72,93 \pm 0,76$  %, teores de proteína de  $5,79 \pm 0,22$  g/ 100g ms e  $4,58 \pm 0,40$  g/100 g ms, teores de cinzas de  $1,96 \pm 0,12$  g/ 100g ms e  $3,15 \pm 1,54$  g/ 100g ms e, por fim, uma concentração de hidratos de carbono de  $11,77 \pm 1,55$  g/ 100g ms e  $15,42 \pm 0,69$  g/ 100g ms. Esta disparidade de resultados comparativamente com o presente estudo, pode estar relacionada com vários factores, particularmente: localização geográfica de produção, condições de cultivo, condições climáticas, condições de colheita, estado de maturação da matéria prima, entre outros (Raigón et al., 2008).

Ossamulu et al. (2014) também compararam nutricionalmente quatro espécies de frutos de *S. melongena*, nomeadamente *Solanum macrocarpon* (redonda), *Solanum aetheopicum*, *Solanum Marcrocapon* (oval) e *Solanum gilo*. Os resultados evidenciaram a semelhança de valores em alguns parâmetros obtidos no presente estudo na variedade *S. melongena*, entre eles o teor em humidade ( $88,31 \pm 0,23$ % a  $91,94 \pm 0,11$ %), cinzas ( $0,41 \pm 0,01$  g/100g mf a  $0,56 \pm 0,02$  g/100g mf) e valor energético ( $34,02 \pm 0,95$  kcal/100g mf a  $22,90 \pm 0,46$  kcal/ 100g mf). No entanto foram notórias algumas discrepâncias na concentração em proteínas ( $1,21 \pm 0,02$  g/100g mf a  $2,36 \pm 0,03$  g/100g mf), gordura ( $0,24 \pm 0,01$  g/100g mf a  $0,42 \pm 0,02$  g/100g mf) e hidratos de carbono ( $4,06 \pm 0,19$  g/100g mf a  $6,03 \pm 0,19$  g/100g mf).

### 4.3. Composição química do fruto da *Solanum melongena* L.

#### 4.3.1. Perfil em açúcares, ácidos orgânicos, tocoferóis e ácidos gordos

A composição química do fruto inteiro e polpa da *Solanum melongena* L. foi avaliada e os resultados dos compostos hidrofílicos (açúcares livres e ácidos orgânicos) e lipofílicos (ácidos gordos e tocoferóis) estão representados nas **Tabelas 8 e 9**, respetivamente.

Tendo em conta a composição em açúcares livres (**Tabela 8**) as amostras estudadas (beringela inteira e polpa) revelaram a presença de dois monossacáridos (frutose e glucose) e dois dissacáridos (sacarose e trealose). Em ambas as amostras, os monossacáridos foram encontrados em quantidades superiores, apresentando concentrações de frutose de 1,26g/100g mf na amostra do fruto inteiro e da polpa; e concentrações de glucose de  $1,25 \pm 0,03$  e  $1,29 \pm 0,01$  g/100g mf no fruto inteiro e polpa, respetivamente. Relativamente à concentração em sacarose foram detetados valores inferiores, oscilando entre  $0,43 \pm 0,02$  (fruto inteiro) e  $0,260 \pm 0,004$  (polpa), assim como aconteceu com a concentração de trealose (fruto inteiro:  $0,100 \pm 0,001$ ; polpa:  $0,080 \pm 0,003$  g/100 mf).

O fruto inteiro apresentou valores de açúcares livres totais de  $3,0 \pm 0,1$  g/100g mf e a polpa valores de  $2,89 \pm 0,01$  g/100g mf.

Tendo em conta a análise estatística dos dados foi notório que o fruto inteiro e a polpa não evidenciaram variações significativas na concentração de frutose ( $p=0,093$ ) e trealose ( $p=0,201$ ), contrariamente ao que aconteceu nas moléculas de glucose, sacarose e teor total de açúcares, onde foram evidentes alterações significativas ( $p<0,05$ ), salientando-se o fruto inteiro com valores superiores, tal como era expectável.

Outros autores (Ayas et al., 2015) também estudaram o perfil individual de açúcares na polpa de sete cultivares de beringela (Aydin Siyahi, Pala 49, Süper pala, Kemer 27, Kadife Kemer, Topan e Kadife). Os resultados evidenciaram a presença de frutose ( $1,242 \pm 0,028$  g/100g mf a  $1,379 \pm 0,051$  g/100g mf), glucose ( $1,275 \pm 0,015$  g/100g mf a  $1,327 \pm 0,047$  g/100g mf) e sacarose ( $0,109 \pm 0,036$  g/100g mf a  $0,494 \pm 0,048$  g/100g mf), em concentrações próximas às do presente estudo.

A composição em ácidos orgânicos (**Tabela 8**) foi também avaliada e revelou, em ambas as amostras, a presença de várias moléculas de interesse, particularmente, dos ácidos oxálico, quínico e málico.

Em geral, foi evidente que o fruto inteiro e a polpa demonstraram a presença das mesmas moléculas, com exceção do ácido fumárico que, apenas foi detectado no fruto inteiro, contudo em quantidades vestigiais. As amostras de fruto inteiro revelaram uma quantidade superior de ácidos oxálico ( $0,381 \pm 0,05$  g/100g mf), quínico ( $0,13 \pm 0,02$  g/100g mf), málico ( $0,349 \pm 0,004$  g/100g mf) e concentração total de ácidos orgânicos ( $0,86 \pm 0,03$  mg/100g mf), comparativamente com as amostras de polpa, onde se obtiveram valores de ácido oxálico, quínico, málico e concentração total de ácidos orgânicos de  $0,38 \pm 0,01$ ;  $0,108 \pm 0,002$ ;  $0,33 \pm 0,02$  e  $0,82 \pm 0,2$ , respectivamente.

Em ambas as amostras o ácido oxálico destacou-se como o ácido orgânico maioritário. De acordo com Kayashima & Katayama (2002), esta molécula está presente em diversas plantas e caracteriza-se pela sua ação antioxidante e pela sua capacidade na preservação de materiais oxidados. Para além disso foi comprovado o seu potencial na indução de resistência contra agentes patógenos (Wang et al., 2009) e, a aptidão para exercer diferentes funções nas plantas e fungos, incluindo proteção contra insetos. A sua utilização abrange diversas áreas, sendo amplamente utilizado no setor alimentar como conservante de frutos e vegetais, com o intuito de estender o tempo de vida útil (Barberis et al, 2019).

Para além desta molécula, também o ácido málico aparece em concentrações similares. Esta molécula destaca-se pela sua capacidade terapêutica, nomeadamente no auxílio da recuperação muscular (sendo utilizado no tratamento de fibromialgia), combate à fadiga e aumento da energia (ao atuar no ciclo de Krebs). Para além disso é, também, comumente utilizado pela indústria alimentar como acidulante, aromatizante e estabilizante, e pela indústria farmacêutica na higienização e regeneração de feridas e queimaduras (Cheng et al., 2017).

O ácido quínico, embora presente em menor concentração, também se caracteriza pelas suas propriedades terapêuticas, nomeadamente pela atividade radioprotetora, antioxidante e anti-inflamatória (Jang et al., 2017).

Relativamente à avaliação estatística dos resultados, foram visíveis variações significativas em todas as moléculas detectadas ( $p < 0,05$ ), com exceção do ácido oxálico ( $p = 0,966$ ).

Outros estudos têm sido realizados para a valorização deste alimento, avaliando a composição em compostos de interesse.

Ayas et al. (2015) estudaram sete variedades de fruto de beringela (Aydin Siyahi, Pala 49, Süper pala, Kemer 27, Kadife Kemer, Topan e Kadife) e, para além do ácido málico ( $129,87 \pm 6,78$  mg/100g mf a  $181,06 \pm 19,46$  mg/100g mf), também identificaram a presença de outros ácidos orgânicos que não foram detectados no presente estudo, nomeadamente os ácidos ascórbico ( $7,69 \pm 1,21$  mg/ 100g mf a  $11,74 \pm 1,33$  mg/100g mf) e cítrico ( $18,98 \pm 0,80$  mg/100g mf a  $21,63 \pm 0,35$  mg/100g mf).

Tal como aconteceu com outras moléculas, a discrepância de resultados obtidos na detecção de ácidos orgânicos pode ser explicada devido a diferenças de variedades dos frutos, nas diferentes condições de cultivo, e na área geográfica onde são produzidas as variedades de *S. melongena*.

**Tabela 8.** Composição em açúcares e ácidos orgânicos do fruto de *Solanum melongena* L. (média  $\pm$  DP).

<b>Teor em açúcares (g/100 g mf)</b>			
	<b>Fruto inteiro</b>	<b>Polpa</b>	<b><i>p</i>-value</b>
Frutose	$1,26 \pm 0,01$	$1,26 \pm 0,1$	0,093
Glucose	$1,29 \pm 0,03$	$1,25 \pm 0,01$	<0,01
Sacarose	$0,43 \pm 0,02$	$0,260 \pm 0,004$	<0,01
Trealose	$0,100 \pm 0,001$	$0,080 \pm 0,003$	0,201
Total	$3,0 \pm 0,1$	$2,89 \pm 0,01$	<0,01
<b>Teor em ácidos orgânicos (g/100 g mf)</b>			
Oxálico	$0,381 \pm 0,005$	$0,38 \pm 0,01$	0,966
Quínico	$0,13 \pm 0,02$	$0,108 \pm 0,002$	<0,01
Málico	$0,349 \pm 0,004$	$0,33 \pm 0,02$	<0,01
Fumárico	tr	nd	-
Total	$0,86 \pm 0,03$	$0,82 \pm 0,2$	<0,01

mf: massa fresca; tr: valor vestigial; nd: não detetado. As diferenças estatísticas das médias foram obtidas através do teste de *t*-student.

Na avaliação da composição em ácidos gordos (**Tabela 9**) foi evidente a presença de 17 moléculas, destacando-se o ácido palmítico (C16:0) como o ácido gordo maioritário, apresentando valores de  $40,5 \pm 0,9$  % e  $44,8 \pm 0,2$  % nas amostras do fruto inteiro e de polpa, respetivamente. Também o ácido esteárico (C18:0) apresentou concentrações relevantes, com valores de  $24,4 \pm 0,2$  % (fruto inteiro) e  $24,4 \pm 0,4$  % (polpa).

Os ácidos gordos saturados foram o principal grupo presente, com valores que oscilaram entre  $83,8 \pm 0,6$  % no fruto inteiro e  $89,6 \pm 0,3$  % na polpa; seguido dos ácidos gordos

polinsaturados (PUFA:  $11,8 \pm 0,4$  % fruto inteiro e  $4,89 \pm 0,04$  % na polpa) e, por fim, dos ácidos gordos monoinsaturados com concentrações de  $4,5 \pm 0,2$  % para o fruto inteiro e  $5,5 \pm 0,3$  % para a polpa. No entanto é importante salientar que embora este grupo se destaque com concentrações mais pronunciadas, são valores muito baixos incapazes de causar efeitos adversos na saúde dos consumidores (Karam et al., 2019).

Relativamente à avaliação estatística dos dados obtidos, foi notória uma variação significativa ( $p < 0,05$ ) nos compostos ácido caproico (C6:0), ácido caprílico (C8:0), ácido cáprico (C10:0), ácido hendecanoico (C11:0), ácido mirístico (C:14), ácido palmítico (C16:0), ácido margárico (C17:0), ácido linoleico (C18:2n6c), ácido  $\alpha$ -linoleico (C18:3n3) e ácido lignocérico (C21:0). Contrariamente ao que aconteceu nas moléculas de ácido láurico (C12:0), ácido pentadecílico (C15:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1n9c), ácido araquídico (C20:0), ácido behênico (C22:0) e ácido tricosanoico (C23:0), onde as pequenas oscilações verificadas entre ambas as amostras estudadas não representaram significância ( $p > 0,05$ ).

Outros autores também estudaram o perfil em ácidos gordos das amostras de beringela. Num estudo realizado por Hanifah et al. (2018), foram avaliados frutos de beringela de 21 variedades morfológicas (cor e formato) diferentes. Para a análise, as amostras foram extraídas com etanol 99,9% e a composição do extrato obtido foi determinada por cromatografia gasosa com detetor de massa acoplado (GC-MS). Entre os ácidos gordos detetados, estão o ácido linoleico, ácido palmítico, ácido araquídico, ácido esteárico, pentanal, ácido eicosanóico, 9-hexadecenoato de etila, tetradecanoato de etila, ácido 3-butenóico, e 9-hexadecenoato de etila. Apesar do estudo apresentar algumas moléculas de ácidos gordos similares ao presente trabalho, a composição é maioritariamente diferente. Isto pode ser justificado, uma vez que se trata da avaliação de diferentes variedades do fruto e/ou pela aplicação de outro método de extração.

Também Ayas et al. (2015) ao avaliar sete cultivares de beringela (Aydin Siyahi, Pala 49, Süper pala, Kemer 27, Kadife Kemer, Topan e Kadife), detetaram a presença de seis moléculas de ácidos gordos (C16:0; C18:0; C18:1; C18:2; C18:3 e C20:0), assim como a composição em SFA de 31,44% a 36,92%, em MUFA de 3,04% a 11,71% e em PUFA de 53,66% a 62,71%, apresentando, portanto, percentagens diferentes das obtidas no presente estudo.

O perfil em tocoferóis também foi avaliado (**Tabela 9**), no entanto não foi detetada nenhuma isoforma deste vitâmero em nenhuma das amostras estudadas (fruto inteiro e polpa).

A presença deste vitâmero nos frutos de *S. melongena* já foi descrita por outros autores. Hanifah et al. (2018) avaliaram 21 variedades de beringela de diferentes cores e morfologias, e em 14 delas foram detetadas  $\alpha$ -tocoferol. Esta discrepância de resultados pode ser explicada, além dos motivos previamente citados para outros parâmetros, devido à degradação desta molécula no momento do descasque da beringela.

**Tabela 9.** Composição em ácidos gordos do fruto de *Solanum melongena* L. (média  $\pm$  DP).

<b>Ácidos gordos (%)</b>			
	<b>Fruto inteiro</b>	<b>Polpa</b>	<b><i>p</i>-value</b>
C6:0	0,56 $\pm$ 0,01	0,59 $\pm$ 0,02	<0,01
C8:0	0,67 $\pm$ 0,03	0,84 $\pm$ 0,01	<0,01
C10:0	1,61 $\pm$ 0,04	2,165 $\pm$ 0,002	<0,01
C11:0	1,1 $\pm$ 0,1	0,58 $\pm$ 0,03	<0,01
C12:0	1,25 $\pm$ 0,03	1,12 $\pm$ 0,04	0,516
C14:0	2,63 $\pm$ 0,03	2,7 $\pm$ 0,1	0,017
C15:0	0,56 $\pm$ 0,03	0,54 $\pm$ 0,01	0,077
C16:0	40,5 $\pm$ 0,9	44,8 $\pm$ 0,2	<0,01
C17:0	1,103 $\pm$ 0,002	0,99 $\pm$ 0,02	<0,01
C18:0	24,4 $\pm$ 0,2	24,4 $\pm$ 0,4	0,443
C18:1n9c	4,5 $\pm$ 0,2	5,5 $\pm$ 0,3	0,462
C18:2n6c	8,0 $\pm$ 0,4	4,10 $\pm$ 0,05	<0,01
C18:3n3	3,8 $\pm$ 0,1	0,79 $\pm$ 0,01	<0,01
C20:0	4,6 $\pm$ 0,2	5,2 $\pm$ 0,1	0,153
C22:0	1,60 $\pm$ 0,04	1,69 $\pm$ 0,03	0,489
C23:0	0,91 $\pm$ 0,03	1,12 $\pm$ 0,02	0,213
C24:0	2,3 $\pm$ 0,1	2,86 $\pm$ 0,04	<0,01
<b>SFA</b>	<b>83,8 <math>\pm</math> 0,6</b>	<b>89,6 <math>\pm</math> 0,3</b>	0,082
<b>MUFA</b>	<b>4,5 <math>\pm</math> 0,2</b>	<b>5,5 <math>\pm</math> 0,3</b>	0,462
<b>PUFA</b>	<b>11,8 <math>\pm</math> 0,4</b>	<b>4,89 <math>\pm</math> 0,04</b>	<0,01
<b>Tocoferóis (mg/100g mf)</b>			
$\alpha$ -tocoferol	nd	nd	-
$\beta$ -tocoferol	nd	nd	-
$\gamma$ -tocoferol	nd	nd	-
$\delta$ -tocoferol	nd	nd	-

Ácido capríco (C6:0); Ácido caprílico (C8:0); Ácido cáprico (C10:0); Ácido hendecanoíco (C11:0); Ácido láurico (C12:0); Ácido mirístico (C14:0); Ácido pentadecílico (C15:0); Ácido palmítico (C16:0); Ácido margárico (C17:0); Ácido esteárico (C18:0); Ácido oleico (C18:1n9c); Ácido linoleico (C18:2n6c); Ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3n3); Ácido araquídico (C20:0); Ácido behênico (C22:0); Ácido tricosanoíco (C23:0); Ácido lignocérico (C24:0); nd: não detetado. As diferenças estatísticas das médias foram obtidas através do teste de *t*-student.

#### 4.3.2. Perfil em compostos fenólicos não antociânicos e antociânicos

O perfil detalhado dos compostos fenólicos presentes nas amostras de beringela (fruto inteiro, polpa e epicarpo) está representado na **Tabela 10**. A tentativa de identificação dos compostos teve por base tempos de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima na região de UV-Vis ( $\lambda_{\max}$ ), íão pseudomolecular ( $[M-H]^-$ ) e fragmentação do íão molecular ( $MS^2$ ), sendo que, sempre que possível foram comparados com padrões disponíveis ou literatura.

No total foram identificados quatro compostos, dos quais três não antociânicos e um antociânico. Dentro dos compostos não antociânicos (**Figura 13A**) foram identificados três ácidos fenólicos, nomeadamente hexóxido de ácido cafeico, ácido protocatecuico e ácido 5-*O*-cafeoilquínico. No que diz respeito aos compostos antociânicos, foi identificado um derivado glicosilado de delfinidina, apenas no epicarpo do fruto, tal como era expectável.

Relativamente aos ácidos fenólicos identificados, o composto 1 ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  341) foi identificado como hexósido de ácido cafeico com base no seu espectro UV ( $\lambda_{\max}$  de 322) e a produção do fragmento  $MS^2$  a  $m/z$  179 e 135, sendo detetado apenas no fruto inteiro e na polpa; o composto 2 ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  153) foi identificado como hexósido de ácido protocatecuico com base no seu espectro UV ( $\lambda_{\max}$  de 294) e a produção do fragmento  $MS^2$  a  $m/z$  108, sendo detectado apenas no epicarpo da beringela e, por fim, o composto 3 ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  353) foi identificado como ácido 5-*O*-cafeoilquínico com base no seu espectro UV ( $\lambda_{\max}$  de 325) e a produção do fragmento  $MS^2$  a  $m/z$  191, 179 e 135. Destacando-se, este último, como o composto maioritário, assim como, o único presente em todas as amostras estudadas, com valores que oscilaram entre  $0,0159 \pm 0,0002$ ;  $0,0337 \pm 0,0004$  e  $0,96 \pm 0,01$  mg/g de extrato para o fruto inteiro, polpa e epicarpo, respetivamente. Os restantes compostos apresentaram concentrações mais baixas, nomeadamente o hexósido de ácido cafeico com teores de  $0,0025 \pm 0,0001$  mg/g de extrato (fruto inteiro) e  $0,0062 \pm 0,0004$  mg/g de extrato (polpa) e o ácido protocatecuico com uma concentração de  $0,37 \pm 0,02$  mg/g de extrato no epicarpo.

Estes ácidos fenólicos detetados nestas amostras possuem propriedades de elevado interesse terapêutico.

O ácido cafeico é um ácido hidroxicinâmico, encontrado em diversos frutos e vegetais, caracterizando-se, principalmente, pelo seu potencial anti-inflamatório e antioxidante, assim como pela sua capacidade terapêutica na prevenção de doenças cardiovasculares, atividade

hipoglicêmica e anti-cancerígena (Park et al, 2006; Araújo, 2014). Por outro lado, o ácido protocatecuico é um dos principais compostos bioativos presente em algumas plantas medicinais, e caracteriza-se pelo seu potencial cardioprotetor, neuroprotetor, antibacteriano, antidiabético, antiviral, analgésico, quimioterápico, anti-inflamatório e antioxidante (Kakkar e Bais, 2014). O ácido 5-*O*-cafeoilquínico é utilizado principalmente na indústria farmacêutica, cosmética e alimentar, e distingue-se por apresentar atividade antimicrobiana, antioxidante, antitumoral e antihistamínica (Forino, 2015).

No epicarpo do fruto, para além de compostos fenólicos não antociânicos, foi também detado um composto fenólico antociânico identificado como delfinidina-*O*-rutinosido (1') ( $[M-H]^+$  a  $m/z$  611). Este composto foi identificado com base no seu espectro UV ( $\lambda_{max}$  de 523) e a produção do fragmento MS<sup>2</sup> a  $m/z$  303(100) (**Figura 13B**) e apresentou uma concentração de  $18.4 \pm 0.7$  mg/g extrato.

As delfinidinas apresentam diversas propriedades bioativas, sendo o composto antociânico com maior efeito benéfico na prevenção de doenças cancerígenas, estando relacionadas com a morte de células apoptóticas ou autofágicas em vários tipos de cancro. Para além disso, apresenta ação antioxidante e anti-inflamatória (Song et al., 2016; Lee et al., 2018).

De acordo com o tratamento estatístico realizado, foi evidente a existência de diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) em todos os compostos, tendo o epicarpo maior concentração de todos os compostos nele identificados.

Outros autores também estudaram o perfil individual de compostos fenólicos das amostras de beringela. Ninõ-Medina et al. (2017), apresenta um estudo de revisão, onde relata que os ácidos fenólicos comumente presentes nos frutos de beringela são os ácidos cafeico e ferúlico, e seus derivados.

Wu e Prior (2005) estudaram a composição em antocianinas do fruto de beringela liofilizado, aplicando uma extração metanol:água:ácido acético (85:15:0,5 v/v) e a deteção realizada por HPLC. Os resultados obtidos permitiram a identificação de quatro derivados de delfinidina nos frutos de beringela: delfinidina-3-rutinosideo, delfinidina-3-rutinosideo-5-glucosídeo, delfinidina-3-glucosideo, delfinidina-3-rutinosideo-5-galactósido.

García-Salas et al., (2014) avaliaram três cultivares de beringela (PSE: roxa listrada, LE: longa e RE: arredondada), cultivadas na Espanha em duas estações do ano diferentes (primavera e verão). Foi realizada uma extração sólido-líquido do pó do fruto liofilizado em solução metanol:água:ácido acético (80:20:0,5 v/v) e a detecção dos compostos fenólicos foi feita através de análise em HPLC. Os resultados mostraram a identificação de 25 compostos, sendo estes na sua maioria derivados do ácido cafeoilquínico. O composto antociânico detectado foi identificado como delfinidina rutinósido. Estes autores avaliaram, também, o efeito da estação de cultivo na composição dos frutos, e concluiu-se que as altas temperaturas do verão afetaram negativamente a composição em compostos fenólicos nos frutos de beringela. Estes resultados obtidos apresentaram maior concentração de compostos fenólicos comparativamente com as amostras estudadas no presente estudo, o que pode ser justificado pela diferença na região de cultivo, variedades dos frutos e/ou os solventes utilizados.

Salerno et al. (2014) avaliaram o teor em compostos fenólicos em amostras de fruto inteiro, polpa e epicarpo da *Solanum melongena* L. cultivadas em Itália. Para tal foi utilizada uma extração assistida por microondas e compostos fenólicos foram detectados através de espectrofotometria. Foram comparados os resultados com diferentes solventes de extração (água, água:etanol (50:50 v/v)) e com as amostras frescas e secas. Os resultados evidenciaram maior concentração de compostos fenólicos no epicarpo do fruto liofilizado, usando como solvente de extração água:etanol (cerca de  $14,25 \pm 0,06$  mg EAG/1,5 g de extrato).

Ferarsa et al. (2018) avaliou a composição em antocianinas no epicarpo de frutos de *S. melongena* L. cultivadas em França. Para tal foram usados dois tipos de extração (maceração e ultrassons), havendo oscilação de vários parâmetros, tal como pH do meio (2, 7 e 12), % de solvente etanol/água (0:100, 50:50, 75:25 e 100:0 % v/v) e temperatura (25, 50, 75 e 100 °C). A determinação dos compostos fenólicos foi realizada por HPLC. Os resultados indicaram que o uso de água acidificada (pH 2,0) apresentou maior poder de extração dos compostos fenólicos, e que o rendimento é melhor ao utilizar os extratos hidroetanólicos (50 e 75%). Quanto à temperatura durante a extração, observou-se que o aumento deste parâmetro levou ao aumento no teor em compostos fenólicos detectados, sendo a temperatura ótima a de 75 °C. Neste estudo, foram identificadas cinco moléculas de antocianinas no epicarpo: delfinidina-3-rutinosídeo, delfinidina-3-rutinosídeo-5-glucosídeo, petunidina-3-rutinosídeo, malvidina-3-rutinosídeo-5-glucosídeo e cyanidina-3-rutinosídeo.

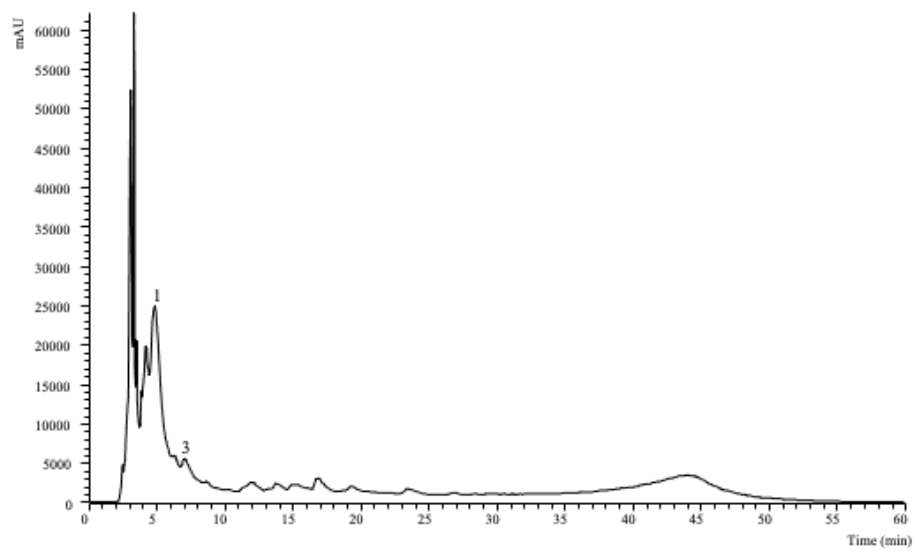
Por fim, um estudo levado a cabo por Horincar et al. (2020) avaliou a composição em compostos fenólicos do extrato do epicarpo dos frutos de *Solanum melongena* L., através de análise dos extratos em HPLC, visando sua aplicação no enriquecimento nutricional da cerveja. A amostra liofilizada foi extraída com etanol 70% e os resultados obtidos mostraram a presença de cinco compostos antociânicos: delphinidina-3-rutinosídeo (82,39%), delphinidina-3-glucosídeo (11,36%), delphinidina-3-rutinosídeo-5-glucosídeo (2,37%) e cianidina-3-rutinosídeo e petunidina-3-rutinosídeo.

A disparidade do perfil fenólico identificado no presente estudo, comparativamente com os estudos anteriores, pode ser explicada por diversos fatores, nomeadamente diferentes condições de cultivo, condições de armazenamento após a colheita, clima, tipo de solo, estação do ano e origem geográfica (García-Salas et al., 2014). Também as diferenças nos métodos de extração utilizados e o tipo de solvente podem ser um fator influente. Para além disso, o teor em compostos fenólicos pode também variar sob efeito de stresses como: poluição atmosférica, exposição a temperaturas extremas, períodos de seca, alta intensidade de luz, entre outros (Bartwal et al., 2013).

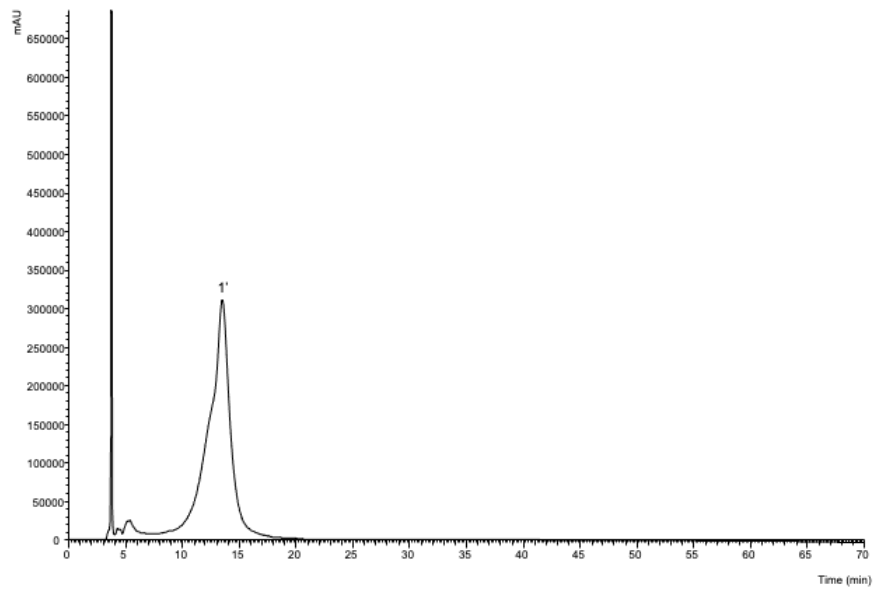
**Tabela 10.** Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima na região de UV-Vis ( $\lambda_{\max}$ ), tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos no extrato hidroetanólico da polpa, epicarpo e do fruto inteiro de *Solanum melongena* L. (média  $\pm$  DP).

Pico	Tr (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	[M-H] <sup>-</sup>	Fragmento principal ESI- MSn [intensidade (%)]	Tentativa de identificação	Quantificação (mg/g extrato)		
						Fruto inteiro	Polpa	Epicarpo
1	4,85	322	341	179(100),135(14)	Hexósido de ácido cafeico <sup>1</sup>	0,0025 $\pm$ 0,0001 <sup>b</sup>	0,0062 $\pm$ 0,0004 <sup>a</sup>	nd
2	5,33	294	153	108(100)	Ácido protocatecuico <sup>2</sup>	nd	nd	0,37 $\pm$ 0,02
3	6,92	325	353	191(100),179(12),135(1)	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquinico <sup>3</sup>	0,0159 $\pm$ 0,0002 <sup>c</sup>	0,0337 $\pm$ 0,0004 <sup>b</sup>	0,96 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
Ácidos fenólicos totais						0,0184 $\pm$ 0,0003 <sup>b</sup>	0,00399 $\pm$ 0,0008 <sup>c</sup>	1,34 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
Pico	Tr (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	[M-H] <sup>+</sup>	Fragmento principal ESI- MSn [intensidade (%)]	Tentativa de identificação	Fruto inteiro	Polpa	Epicarpo
1'	13,56	523	611	303(100)	Delfinidina- <i>O</i> -rutinósido <sup>4</sup>	nd	nd	9,2 $\pm$ 0,2

nd: não detetado; Tr – tempo de retenção. Curvas de calibração usadas: 1 - ácido cafeico ( $y = 388345x + 406369$ ); 2 - ácido protocatecuico ( $y = 214168x + 27102$ ); 3 - ácido clorogénico ( $y = 168823x - 161172$ ); 4 - cianidina-3-*O*-glucósido ( $y = 243287x + 1e^6$ ). As diferenças estatísticas das médias foram obtidas através de uma análise de variância one-way (ANOVA). Em cada linha, para cada tipo de extrato (fruto inteiro, polpa e epicarpo) letras diferentes significam diferenças significativas entre as quantidades totais de compostos ( $p < 0,05$ ).



(A)



(B)

**Figura 13.** Perfil de compostos fenólicos não antocianínicos (A) e antocianínicos (B) dos extratos hidroetanólicos do fruto de *S. melongena* (fruto inteiro e epicarpo, respectivamente) registados a 280 nm (i) e 520 nm (ii). A correspondência da numeração de picos é apresentada na Tabela 10.

#### **4.4. Atividade antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, hepatotóxica e anti-inflamatória do extrato hidroetanólico obtido a partir do epicarpo de *S. melongena* pelo método convencional**

Para avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroetanólico das amostras de *S. melongena* (fruto inteiro, polpa e epicarpo), foram aplicados dois métodos colorimétricos *in vitro* (inibição da peroxidação lipídica – TBARS e inibição da hemólise oxidativa - OxHLIA) e os resultados estão presentes na **Tabela 11**.

Relativamente aos valores de  $EC_{50}$  obtidos, o extrato revelou potencial antioxidante em todos os ensaios realizados, contudo os valores mais baixos de  $EC_{50}$  (melhor atividade antioxidante) foram obtidos no ensaio de OxHLIA.

No ensaio de TBARS os valores de  $EC_{50}$  oscilaram entre  $135 \pm 6$  e  $8941 \pm 284$   $\mu\text{g/mL}$ , evidenciando melhor atividade o epicarpo ( $135 \pm 6$   $\mu\text{g/mL}$ ), seguido da polpa ( $4289 \pm 178$   $\mu\text{g/mL}$ ) e, por fim, o fruto inteiro ( $8941 \pm 284$   $\mu\text{g/mL}$ )

No ensaio de OxHLIA os extratos hidroetanólicos estudados também revelaram melhor capacidade antioxidante na amostra de epicarpo ( $34 \pm 1$   $\mu\text{g/mL}$ ), seguido da polpa ( $82 \pm 3$   $\mu\text{g/mL}$ ) e, por fim, o fruto inteiro ( $119 \pm 7$   $\mu\text{g/mL}$ ).

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de estudar o potencial antioxidante (através de ensaios *in vitro*) de diferentes partes de beringela.

No estudo levado a cabo por Akanitapichat et al. (2010) foi estudado o potencial oxidante de cinco variedades de *S. melongena* obtidas na Tailândia (SM1: uniforme, roxa, tamanho moderado; SM2: branca e verde, tamanho moderado; SM3: alongada e verde; SM4: listrada, verde, tamanho moderado; SM5: uniforme, verde claro, tamanho pequeno). Foram realizados ensaios *in vitro* utilizando o método da atividade captadora de radicais DPPH e ABTS, que medem o poder antioxidante dos extratos naturais, a fim de eliminar radicais livres (DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>, respetivamente) gerados no ensaio. No ensaio DPPH os valores de  $EC_{50}$  oscilaram entre  $61,44 \pm 4,14$  e  $159,33 \pm 2,87$   $\mu\text{g/mL}$ , enquanto no ensaio ABTS os valores de  $EC_{50}$  oscilaram entre  $53,18 \pm 0,71$  e  $105,63 \pm 1,90$   $\mu\text{g/mL}$ .

Por outro lado, Kandoliya et al. (2015) avaliou seis variedades de beringela (não especificadas) cultivadas na Índia quanto ao seu potencial antioxidante, utilizando também o ensaio da atividade captadora de radicais DPPH. Perante os resultados obtidos,

foi possível observar que os frutos apresentaram atividade antioxidante variando entre 25,17 e 40,35%, e, foi notório que este potencial foi menor em variedades com menor composição em compostos fenólicos.

Por fim, Hong et al. (2018) estudaram a atividade antioxidante do extrato butanólico de duas variedades de *S. melongena* (Makkhuayao e Makhurapro) cultivadas na Tailândia, através do ensaio da atividade captadora de radicais DPPH. Os resultados comprovaram a existência da ação antioxidante do extrato, com valores de EC<sub>50</sub> de 1,85 ± 0,27 mg/mL e 1,66 ± 0,14 mg/mL.

**Tabela 11.** Atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos do fruto inteiro, polpa e epicarpo de *S. melongena*.

Atividade antioxidante	Concentração		
	Fruto Inteiro	Polpa	Epicarpo
TBARS (Valores de EC <sub>50</sub> , µg/mL)	8941 ± 284 <sup>a</sup>	4291 ± 178 <sup>b</sup>	135 ± 6 <sup>c</sup>
OxHLIA ( $\Delta t = 60$ min) (Valores de EC <sub>50</sub> , µg/mL)	119 ± 7 <sup>a</sup>	82 ± 3 <sup>b</sup>	34 ± 1 <sup>c</sup>

Valores de EC<sub>50</sub> values: Concentração de extrato correspondente a 50% da atividade antioxidante. Trolox (control positivo) EC<sub>50</sub> = 23 µg/mL (inibição de TBARS) e 85 µg/mL (OXHLIA). As diferenças estatísticas das médias foram obtidas através de uma análise de variância one-way (ANOVA). Em cada linha, para cada tipo de extrato (fruto inteiro, polpa e epicarpo) letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Na **Tabela 12**, estão apresentados os resultados obtidos na atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico do fruto de *S. melongena* (fruto inteiro, polpa e epicarpo). Estes extratos foram testados contra um painel de bactérias patogênicas (bactérias Gram-positivos e Gram-negativos) e fungos.

Tendo em conta os resultados obtidos foi evidente atividade bacteriostática (CMI) e bactericida (CMB) frente a todas as culturas bacterianas estudadas, destacando-se os extratos obtidos a partir do epicarpo e do fruto inteiro com os melhores resultados (CMI entre 2,00 e 4,00 mg/mL. De outro modo, o potencial bactericida evidenciou, para todos os extratos, valores de CMB de 4,00 e 8,00 mg/mL. *Escherichia coli* (*E.c.*) destacou-se como a estirpe que, em todos os casos, demonstrou uma atividade mais susceptível ao potencial bactericida e bacteriostático de todos os extratos (fruto inteiro, polpa e epicarpo).

Na avaliação do potencial antifúngico de todos os extratos hidroetanólicos, apenas a polpa apresentou atividade fungicida (CMI) e fungistática (CMF) contra algumas estirpes, nomeadamente *Penicillium fumiculosum* (*P.f.*) e *Penicillium ochrochloron* (*P.o.*). Esta amostra apresentou valores de CMI e CMF de 8,00 e 1,00 mg/mL para *P.f.* e *P.o.*, respetivamente.

Hong et al. (2018) estudaram a atividade antibacteriana do fruto da beringela pelo método de disco-difusão em ágar, usando as estirpes *E. coli*, *Burkholderia sp.*, *Haemophilus somnus*, *Haemophilus parsuis*, *Clostridium perfringens* e *Pantoea agglomerans*; e os resultados mostraram que os extratos apenas apresentaram atividade antibacteriana contra *Burkholderia sp.* e *Pantoea agglomerans*.

Para a atividade antifúngica não foram encontrados estudos disponíveis na literatura do fruto de beringela. Contudo, Das et al. (2008) avaliaram o potencial fungicida das folhas de *Solanum melongena* L. pelo teste de difusão em ágar, contra as estirpes *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsuran*, *C. albican* e *T. beigelii*, e os resultados mostraram potencial antifúngico da planta.

**Tabela 12.** Atividade antibacteriana (CMI e CMB mg/mL) e antifúngica (CMI e CMF mg/mL) dos extratos de beringela (fruto inteiro, epicarpo e polpa).

Atividade Antibacteriana							
Extratos		<i>S.a.</i>	<i>L.m.</i>	<i>E.c.</i>	<i>En.cl.</i>	<i>S.t.</i>	
Epicarpo	CMI	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	
	CMB	8,00	8,00	4,00	8,00	8,00	
Fruto inteiro	CMI	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	
	CMB	8,00	8,00	4,00	8,00	8,00	
Polpa	CMI	4,00	4,00	2,00	8,00	8,00	
	CMB	8,00	8,00	4,00	8,00	8,00	
Ampicilina	CMI	0,012	0,40	0,40	0,006	0,75	
	CMB	0,025	0,50	0,50	0,012	1,20	
Atividade Antifúngica							
Extratos		<i>A.fum.</i>	<i>A.v.</i>	<i>A.n.</i>	<i>P.f.</i>	<i>P.o.</i>	<i>T.v.</i>
Epicarpo	CMI	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
	CMF	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
Fruto inteiro	CMI	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
	CMF	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00	>8,00
Polpa	CMI	>8,00	>8,00	>8,00	8,00	1,00	>8,00
	CMF	>8,00	>8,00	>8,00	8,00	1,00	>8,00
Cetoconazol	CMI	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20

	CMF	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,30
<i>S.a.</i> : <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>L.m.</i> : <i>Listeria monocytogenes</i> ; <i>E.c.</i> : <i>Escherichia coli</i> ; <i>En.cl.</i> : <i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>S.t.</i> : <i>Salmonella thyphimurium</i> ; <i>Afun.</i> : <i>Aspergillus fumigatus</i> ; <i>Av.</i> : <i>Aspergillus versicolor</i> ; <i>A.n.</i> : <i>Aspergillus niger</i> ; <i>P.f.</i> : <i>Penicillium fumiculosum</i> ; <i>P.o.</i> : <i>Penicillium ochrochloron</i> ; <i>T.v.</i> : <i>Trichoderma viride</i> . CMI: concentração mínima inibitória, CMB: concentração mínima bactericida; CMF: concentração mínima fungicida.							

Relativamente aos resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade e hepatotoxicidade (**Tabela 13**), foi notório que o único extrato hidroetanólico (80:20 v/v) que revelou potencial inibitório ( $GI_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$ ) foi obtido a partir do epicarpo de *S. melongena*, evidenciando a sua capacidade anti-proliferativa nas linhas tumorais HeLa, NCI H460 e HepG2. Esse potencial foi demonstrado por valores de  $GI_{50}$  de  $336,53 \pm 6,74 \mu\text{g/mL}$  para a linha HeLa,  $338,20 \pm 15,58 \mu\text{g/mL}$  para a linha NCI H460 e, por fim,  $283,60 \pm 9,69 \mu\text{g/mL}$  para a linha HepG2.

Foi também evidente a ausência de toxicidade de todas as amostras estudadas ( $GI_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$ ), através da avaliação da hepatotoxicidade onde foi utilizada uma cultura de células primárias não-tumorais (PLP2).

Akanitapichat et al. (2010), avaliou o potencial hepatoprotetor de cinco variedades de *S. melongena* obtidas na Tailândia (SM1: uniforme, roxa, tamanho moderado; SM2: branca e verde, tamanho moderado; SM3: alongada e verde; SM4: listrada, verde, tamanho moderado; SM5: uniforme, verde claro, tamanho pequeno). Para tal foi usada a linha celular HepG2 e os resultados demonstraram efeito hepatoprotetor em todas as amostras avaliadas.

Relativamente ao potencial anti-inflamatório dos extratos (**Tabela 13**), avaliados no presente estudo por ensaio *in vitro*, usando células de macrófago RAW264,7, não foi detetada atividade ( $> 400 \mu\text{g/mL}$ ).

Relativamente a esta atividade biológica, não foram encontrados na literatura estudos relativos ao potencial anti-inflamatório dos frutos de beringela. No entanto, Im et al. (2016) estudaram este potencial no caule da planta de *S. melongena*, através de ensaio *in vitro* usando células de macrófago RAW 264,7. De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que os extratos hidroetanólicos do caule da beringela exibiram efeito anti-inflamatório, ao reduzir a produção de óxido nítrico (NO), enzima sintase do óxido nítrico (iNOS), citocinas pró-inflamatórias, ciclooxigenase-2 (COX-2) e prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>).

**Tabela 13.** Atividade citotóxica dos extratos de beringela (fruto inteiro, epicarpo e polpa) (média ± DP).

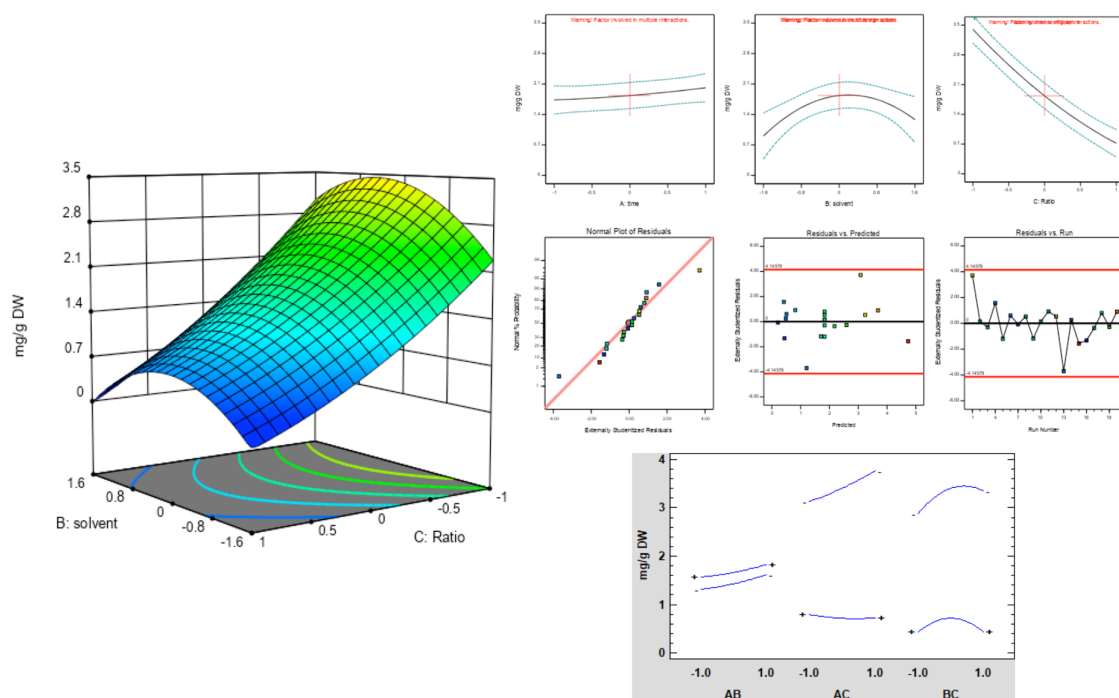
<b>Atividade Citotóxica</b>			
<b>GI<sub>50</sub> (µg/mL)</b>	<b>Fruto inteiro</b>	<b>Polpa</b>	<b>Epicarpo</b>
HeLa	> 400	> 400	336,53 ± 6,74
NCI-H460	> 400	> 400	338,20 ± 15,58
MCF 7	> 400	> 400	> 400
HepG2	> 400	> 400	283,60 ± 9,69
PLP2	> 400	> 400	> 400
<b>Atividade Anti-inflamatória</b>			
RAW264,7	> 400	> 400	> 400

HeLa: carcinoma cervical; NCI-H460: carcinoma de pulmão; MCF7: carcinoma da mama; HepG2: carcinoma hepatocelular; PLP2: cultura primária de células de fígado de porco.

#### **4.5. Otimização do processo de obtenção de um extrato corante à base de antocianinas a partir do epicarpo de *S. melonera***

##### **4.5.1. Efeito da concentração de solvente**

A concentração de etanol influencia diretamente a polaridade e a viscosidade do extrator em termos físico-químicos; no entanto, a percentagem utilizada afetará a transferência de massa dos compostos-alvo no processo de extração. Nesse sentido, os efeitos da concentração de etanol nos rendimentos de extração de biomoléculas foram analisados num intervalo de 8 a 92% de concentração (v/v). A partir da representação visual da **Figura 14**, os rendimentos de extração dos constituintes desejados aumentaram, com o aumento da concentração de etanol no intervalo de 54 - 64% (v/v), mas não mais do que isso, uma vez que a diminuição da recuperação é evidente em todos os casos. A razão para esse comportamento na concentração de etanol pode ser atribuída à polaridade do solvente, o que facilita a dissolução das antocianinas específicas analisadas. Como resultado, 54 - 64% da concentração de etanol alcançou maiores rendimentos de extração, semelhantes aos resultados mostrados por Muangrat et al. (2018) numa matriz alimentar diferente.



**Figura 14.** Representação gráfica de RSM para a resposta  $Y_1$  (mg/g de antocianinas por massa seca). (Da esquerda para a direita e de cima para baixo: Modelagem da representação dos dados obtidos com fator tempo zero; comportamento fatorial único do tempo; comportamento fatorial único do solvente; comportamento fatorial único da razão; Gráfico normal de resíduos; resíduos versus valores previstos; valores previstos versus execução; interação fatorial).

**Tabela 14.** Projeto central composto e dados experimentais para análise da superfície de resposta de 5 níveis e 3 fatores.

Extração	Fatores			Respostas		
	Tempo (min)	Solvente (%)	Razão (g/L)	Antocianinas (mg/g de massa seca)	Antocianinas (mg/g de extrato)	Rendimento %
1	-1	-1	-1	2,45	6,81	35,98
2	-1	-1	1	3,27	9,95	32,83
3	-1	1	-1	3,47	11,83	29,38
4	-1	1	1	3,78	11,49	32,93
5	1	-1	-1	0,50	1,71	29,36
6	1	-1	1	0,16	0,66	24,12
7	1	1	-1	0,60	2,41	24,76
8	1	1	1	0,67	2,55	26,15
9	1,68	0	0	1,43	5,63	25,47
10	-1,68	0	0	2,07	7,12	29,12
11	0	-1,68	0	0,96	6,91	13,97
12	0	1,68	0	0,64	4,50	14,33
13	0	0	-1,68	3,97	6,76	32,78
14	0	0	1,68	0,17	0,52	26,08
15	0	0	0	1,70	6,70	25,42

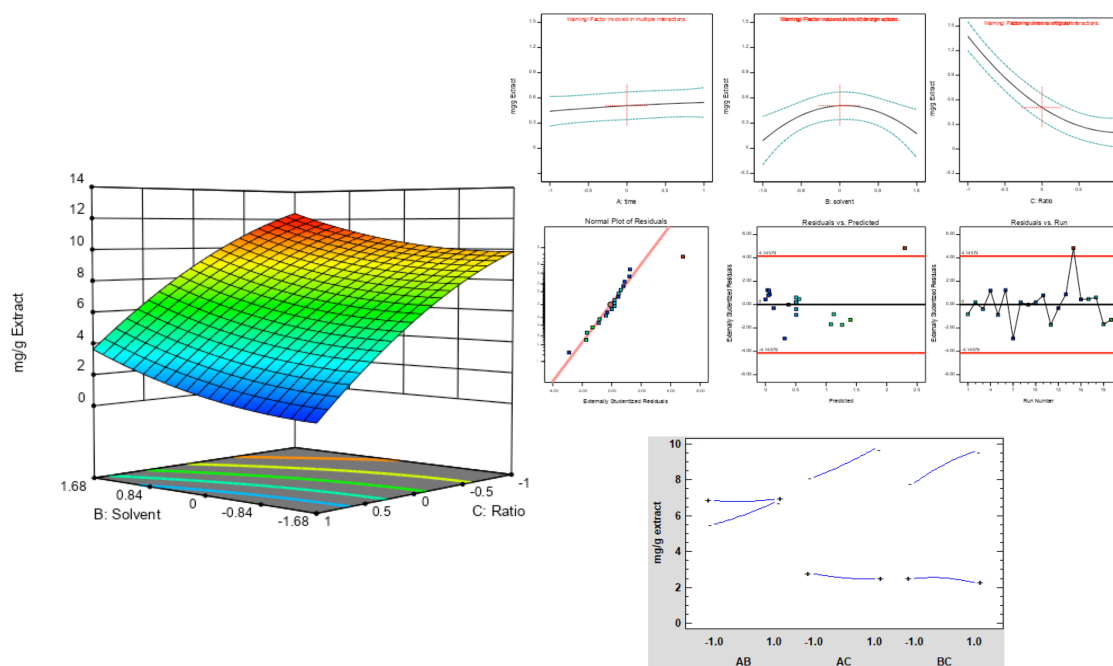
---

16	0	0	0	1,44	5,89	24,53
17	0	0	0	1,96	7,23	27,14
18	0	0	0	1,85	6,42	28,83
19	0	0	0	2,04	6,97	29,32
20	0	0	0	1,74	6,43	26,92

---

#### 4.5.2. O efeito da razão sólido-líquido

Foram avaliados os efeitos da proporção de um sólido (em pó) dissolvido numa percentagem específica de um volume fixo de líquido, nos rendimentos da extração de antocianinas, no intervalo de 5 a 65 g/L. Os resultados obtidos foram ilustrados na **Figura 15**. Os resultados indicaram que baixas quantidades de amostra sólida tiveram maior impacto nos rendimentos de extração das biomoléculas, aumentando notavelmente o rendimento em antocianinas, com o aumento do volume do solvente. Assim, quantidades menores com volumes mais altos acelerariam a difusão de compostos da amostra, devido à maior área de superfície de contato. De fato, as quantidades de antocianinas extraídas pela extração assistida por ultrassons diminuíram quando a matriz analisada aumentou, quase de maneira linear, até atingir o ponto de saturação. Grandes quantidades de sólido em relação ao líquido formariam facilmente agregados e reduziriam a superfície de contato, resultando em um obstáculo à transferência de massa (Taofiq et al., 2019). Assim, foram escolhidos 5 g de matriz por litro da razão solvente, como concentração ótima de razão sólido-líquido neste processo de otimização.

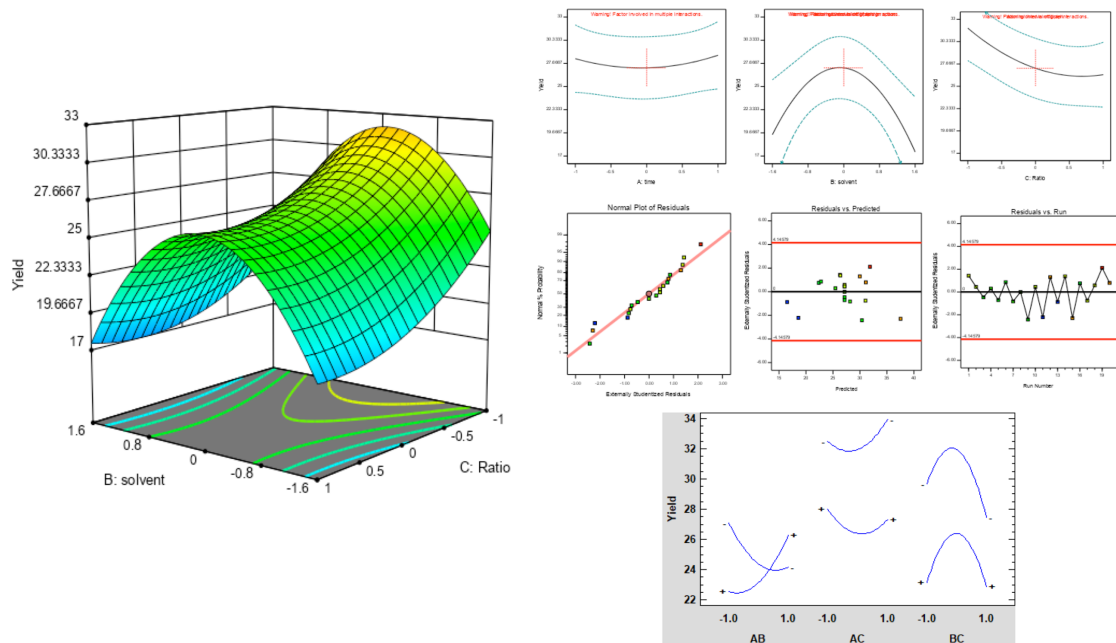


**Figura 15.** Representação gráfica de RSM para a resposta Y2 (mg/g de extracto). (Da esquerda para a direita e de cima para baixo: Modelagem de representação dos dados obtidos com fator tempo zero; comportamento fatorial único do tempo; comportamento fatorial único do solvente; comportamento fatorial único da razão; Gráfico normal de resíduos; resíduos versus valores previstos; valores previstos versus execução; interação fatorial.)

#### 4.5.3. O efeito do tempo de extração

O tempo de extração é um parâmetro-chave na influência do rendimento de extração de flavonóides, o que levou a ser um dos parâmetros também investigado neste trabalho, num intervalo de 0,5 a 5,5 min. Na **Figura 16**, é importante analisar que, para além do gráfico de RSM estar no efeito de interação, podemos também observar que foram encontradas interações entre tempo e solvente, as quais, embora o fator tempo seja estatisticamente não significativo, é importante incluir os termos da equação quadrática, pelo menos para a resposta Y<sub>3</sub> (rendimento), onde esse fenómeno é amplamente expresso. Inicialmente, foram testados diferentes tempos de extração antes da execução desse DCCC, tendo sido descartados tempos mais longos, uma vez que mostraram diferenças não significativas. Embora tenham sido utilizados tempos curtos podemos observar que o efeito principal da extração assistida por ultrassons é produzido poucos segundos após a extração, tal como se verificou num trabalho realizado anteriormente por Melgar et al., (2019). Aparentemente a combinação do efeito da cavitação com o tamanho das partículas finas e, como mencionado na **secção 4.5.2**, a percentagem de solvente tem uma reação muito pronunciada sobre a extração das moléculas bioativas. Desta forma,

reconhecendo a relevância da extração assistida por ultrassons, é possível economizar muito tempo, energia e custos, aumentando a importância da otimização do processo de extração.



**Figura 16.** Representação gráfica de RSM para a resposta Y3 (rendimento). (Da esquerda para a direita e de cima para baixo: Modelagem de representação dos dados obtidos com fator tempo zero; comportamento fatorial único do tempo; comportamento fatorial único do solvente; comportamento fatorial único da razão; Gráfico normal de resíduos; resíduos versus valores previstos; valores previstos versus execução; interação fatorial.)

#### 4.5.4. Análise estatística e ajuste do modelo

Na **Tabela 15**, a análise ANOVA dos dados experimentais das 20 extrações foi aplicada, a fim de ajustar uma equação polinomial de segunda ordem, usando o software Design-Expert e Statgraphics, para correlacionar a relação de cada variável independente com as respostas obtidas. Os modelos polinomiais finais de segunda ordem para a extração do epicarpo ( $Y_1$ ), do extrato ( $Y_2$ ) e rendimento recuperado ( $Y_3$ ) são apresentados pelas seguintes equações:

$$Y_1 = 1,83 + 0,14 * time + 0,12 * solv - 1,34 * ratio - 0,29 * sov^2 + 0,23 * ratio^2$$

**Equação 7.** Modelo polinomial final de segunda ordem para a extração do epicarpo.

$$Y_2 = 0,61 + 0,44 * time + 0,72 * solv - 1,86 * ratio - 0,32 * solv^2 + 1,05 * ratio^2$$

**Equação 8.** Modelo polinomial final de segunda ordem para o extrato.

$$Y_3 = 27.34 + 0.20 * time - 0.62 * solv - 5.10 * ratio + 1.66 * time * solv - 4.62 * solv^2 + 6.61 * ratio^2$$

**Equação 9.** Modelo polinomial final de segunda ordem para o rendimento recuperado.

A significância de cada coeficiente foi determinada nos modelos de regressão e na análise de variância (ANOVA), a partir da qual os termos numéricos foram exibidos nas **Equações 7-9**. Os resultados da ANOVA podem ser usados para avaliar se os modelos de regressão foram estabelecidos com sucesso pelos valores de  $p$  ( $<0,05$ ) num nível de confiança juntamente com a análise de falta de ajuste ( $p>0,05$ ), o que implicava que a falta de ajuste não era significativa em relação ao erro puro, revelando que os modelos desenvolvidos foram bem-sucedidos. Além disso, os coeficientes de correlação do modelo de segunda ordem ( $R^2$ ) com mais de 0,94 demonstraram que os modelos com alta significância estatística foram bem ajustados às experiências. Assim, com base na análise estatística acima, os modelos foram adequados para prever os rendimentos de extração de antocianinas.

**Tabela 15.** Análise estatística (ANOVA), incluindo termos de resposta para a construção de modelos preditivos e valores ideais de resposta para os critérios de resposta paramétricos.

		Extração			
		Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>	
<b>Modelo</b>		< 0,0001	0,00	< 0,0001	
<b>Intercepção</b>	<b>b<sub>0</sub></b>	0,15	0,08	0,82	
	<b>Linear</b>	<b>b<sub>1</sub></b>	0,22	0,02	0,47
		<b>b<sub>2</sub></b>	< 0,0001	0,00	0,00
		<b>b<sub>3</sub></b>	0,93	0,15	0,15
<b>Interação</b>	<b>b<sub>12</sub></b>	0,17	0,04	0,63	
	<b>b<sub>13</sub></b>	0,34	0,03	0,66	
	<b>b<sub>23</sub></b>	0,67	0,57	0,97	
<b>Quadratico</b>	<b>b<sub>11</sub></b>	0,01	0,07	0,00	
	<b>b<sub>22</sub></b>	0,03	0,00	< 0,0001	
	<b>b<sub>33</sub></b>	0,00	0,00	0,00	

<b>Informação estatística da análise de adaptação</b>			
<b>Observações</b>	20	20	20
<b>R<sup>2</sup></b>	0,96	0,94	0,94
<b>R<sup>2</sup>adj</b>	0,93	0,98	0,88
<b>Resposta de otimização factorial</b>			
	<b>max</b>	<b>max</b>	<b>max</b>
<b>Valor ótimo</b>	5,64	12,15	43,04
<i>x</i> <sub>1</sub>	0,54	0,52	0,55
<i>x</i> <sub>2</sub>	64,2398	58,4479	54,1773
<i>x</i> <sub>3</sub>	4,65966	4,65966	4,66865
<b>Otimização geral</b>			
	<b>max</b>	<b>max</b>	<b>max</b>
<b>Resposta ótima (Y)</b>	5,53	11,96	40,96
<b>Desejabilidade</b>	1		
<b>Valor factorial ideal</b>	<i>X</i> <sub>1</sub> = 0,5	<i>X</i> <sub>2</sub> = 68,2	<i>X</i> <sub>3</sub> = 5

R<sup>2</sup>: coeficientes de regressão; R<sup>2</sup>adj: coeficientes de regressão ajustados. As respostas são resumidas como Y<sub>1</sub>: Antocianinas totais (mg/g de massa seca), Y<sub>2</sub>: Antocianinas totais (mg/g de extrato), Y<sub>3</sub>: Rendimento (%). Variáveis fixas são resumidas como X<sub>1</sub> = tempo (min); X<sub>2</sub> = concentração de etanol (%); X<sub>3</sub> = razão sólido/líquido (g/L).

#### 4.5.5. Otimização da análise da metodologia de superfície de resposta

Em resumo, os valores ótimos obtidos através da otimização da extração utilizando a técnica de ultrassons são divididos em valores de resposta específicos: Y<sub>1</sub> (solvente = 64%; razão = 5 g/L; e tempo = 0,5 min), Y<sub>2</sub> (solvente = 58%; razão = 5 g/L; e tempo = 0,5 min), e Y<sub>3</sub> (solvente = 54%; razão = 5 g/L; e tempo = 0,5 min); e em valores gerais de otimização para as três respostas envolvidas: com um valor ótimo de incapacidade de 0,99, 58,4% de concentração de etanol (v/v), 5 gramas de *S. melongena* por litro de solvente e 0,5 min de tempo de extração.

## 5. Considerações finais e perspectivas futuras

A aplicação de corantes na indústria alimentar constitui um fator de elevada relevância, uma vez que, a cor dos produtos é um dos aspetos organolépticos que influencia de forma direta a preferência e escolha dos consumidores. Tal influência leva à necessidade massiva de aplicação de corantes sintéticos neste setor. Desta forma, com o objetivo de dar aos consumidores uma opção alternativa mais saudável, a ciência e a indústria têm investido na obtenção e aplicação de pigmentos naturais com o mesmo efeito corante que os seus análogos sintéticos. Esta substituição além de conferir a pigmentação desejada ao produto, vai também acrescentar nutrientes e propriedades bioativas aos alimentos.

As antocianinas, são compostos que, para além da sua aplicabilidade como pigmentos naturais, também possuem propriedades medicinais e terapêuticas de interesse e estão presentes num vasto leque de matrizes naturais, como é o caso do fruto de *Solanum melongena* L. (beringela).

Neste sentido, o presente estudo levou a cabo a caracterização do fruto de *Solanum melongena* L. avaliando os parâmetros físicos, nutricionais e químicos de diferentes partes da matriz, tendo em conta a sua forma de consumo: fruto inteiro, polpa e epicarpo. Para além disso, foi também realizada a avaliação das propriedades bioativas do mesmo, através dos ensaios *in vitro* de atividade antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, hepatotóxica e anti-inflamatória.

Para além disso, tendo em conta a necessidade da procura de matrizes alternativas para a obtenção de pigmentos corantes naturais, o objetivo fulcral deste trabalho consistiu na otimização do processo de extração, que permitiu a definição dos seus parâmetros ideais (tempo, % etanol e razão sólido/líquido) para a obtenção de um extrato com maior concentração de antocianinas e, conseqüentemente, maior potencial corante.

Na avaliação da cor efetuada nas amostras de epicarpo foi possível constatar que o processo de liofilização levou a uma ligeira alteração da cor das amostras, indicando a preservação dos compostos antociânicos após a desidratação. Por outro lado, a avaliação nutricional, realizada no fruto inteiro e na polpa, evidenciou que a beringela possui baixo valor energético e teor em gorduras, mas alto teor em humidade, confirmando o interesse deste fruto em dietas de restrição calórica.

No que concerne à composição química, também avaliada no fruto inteiro e na polpa, através do estudo dos perfis individuais em açúcares, ácidos orgânicos, ácidos gordos e tocoferóis, foi possível detetar quatro moléculas de açúcar, destacando-se a frutose e a glucose como as maioritárias; enquanto que os ácidos orgânicos, revelaram a presença de maior concentração dos ácidos oxálico e málico. Para além disso, foram detetadas 17 moléculas de ácidos gordos, sendo os ácidos gordos saturados o principal grupo presente, destacando-se o ácido palmítico e o ácido esteárico; e não foi detetada a presença de tocoferóis nas amostras analisadas.

A composição em compostos fenólicos das amostras (fruto inteiro, polpa e epicarpo) indicou a presença de quatro compostos, dos quais três não antociânicos (hexósido de ácido cafeico, ácido protocatecuico e ácido 5-*O*-cafeoilquínico) e um antociânico (delfinidina-*O*-rutinósido), sendo o último presente somente no epicarpo.

Relativamente à avaliação das bioatividades, o extrato hidroetanólico revelou potencial antioxidante em todos os ensaios, evidenciando melhor atividade no epicarpo, o que pode ser explicado pela presença dos compostos fenólicos, ácidos gordos e ácidos orgânicos previamente identificados nos frutos. Foi também constatada atividade bacteriostática e bactericida frente a várias estirpes bacterianas estudadas. Contudo, na avaliação do potencial antifúngico, somente a polpa apresentou atividade fungicida e fungistática contra algumas estirpes. Por fim, os ensaios de citotoxicidade e hepatotoxicidade evidenciaram que o único extrato hidroetanólico com potencial inibitório foi o obtido a partir do epicarpo de *S. melongena*, evidenciando a sua capacidade anti-proliferativa nas linhas tumorais HeLa, NCI H460 e HepG2. Foi também evidente a ausência de toxicidade em todas as amostras avaliadas, assim como, a ausência de potencial anti-inflamatório.

A viabilidade das moléculas bioativas também depende da capacidade de extração realizada, por isso o desenho experimental estatístico foi aplicado a fim de minimizar os procedimentos experimentais e maximizar os resultados, podendo determinar o ponto ideal de extração através de modelagem matemática, usando a metodologia da superfície de resposta. Essa abordagem permitiu entender o compostamento das principais variáveis e também a força da interação, o que forneceu uma representação visual que ajudou a selecionar os pontos ideais de extração.

Estes resultados confirmam a excelente composição química e nutricional da beringela que, aliada às propriedades bioativas identificadas, fazem com que este represente uma excelente opção para incorporar na dieta diária. Para além disso, as suas propriedades terapêuticas tornam este fruto muito promissor para aplicação na indústria farmacêutica e cosmética.

Tendo em conta a presença de antocianinas no epicarpo, torna este fruto com potencial aplicação no setor industrial, nomeadamente através do aproveitamento do pigmento corante natural.

Neste sentido, esta tese apresenta um tema com elevada relevância para diversos setores, como industrial, ambiental, científico, económico e social. Essa ampla relevância é justificada pela proposta de desenvolver estratégias que reduzam o desperdício de alimentos, melhorando a qualidade de alguns produtos comerciais. Para além disso, conduz à aplicação de tecnologias de extração inovadoras, ao aumento da qualidade dos produtos disponíveis no mercado, ao aumento da preferência do consumidor por esses produtos e, conseqüentemente, à melhoria do impacto ambiental, ao crescimento económico e ao desenvolvimento de uma economia sustentável.

Como perspetivas futuras, seria importante avaliar o potencial bioativo do extrato ótico rico em antocianinas e o seu potencial corante, através da sua incorporação em matrizes alimentares, assim como, a realização de estudos de estabilidade.

## Bibliografia

- Akanitapichat, P., Phraibung, K., Nuchklang, K., Prompitakkul, S. (2010). Antioxidant and hepatoprotective activities of five eggplant varieties. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3017-3021.
- Albuquerque, B.R., Prieto, M.A., Barreiro, M.F., Rodrigues, A., Curran, T.P., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R. (2017). Catechin-based extract optimization obtained from *Arbutus unedo* L. fruits using maceration/microwave/ultrasound extraction techniques. *Industrial Crops and Products*, 95, 404-415.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 7915–7922.
- Andersen, O.M., Cabrita, L., Fossen, T. (1998). Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry*, 63, 4, 435-440.
- AOAC (2016). AOAC official methods of analysis, 20th edn, AOAC International, Rockville.
- Araújo, V.M. (2014). Estudo do potencial terapêutico do ácido cafeico em protocolos de diabetes e dislipidemia em camundongos. Tese de mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Ceará, 99p.
- Ayas, F.A., Colak, N., Topuz, M., Tarkowski, P., Jaworek, P., Seiler, G., Inceer, H. (2015). Comparison of Nutrient Content in Fruit of Commercial Cultivars of Eggplant (*Solanum melongena* L.). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 65, 251-259.
- Badulescu, L., Dobrin, A., Stan, A., Mot, A., Bujor, O.C. (2019). Drying treatment effects on anthocyanins of organic raspberry (cv. Heritage) fruit. Em Livro de Atas de Third Nordic Baltc Drying Conference, 12-14 junho, São Petersburgo, Rússia, 48-53.
- Barberis, A., Cefola, M., Pace, B., Azara, E., Spissu, Y., Serra, P.A., Logrieco, A.F., D'hallewin, G., Fadda, A. (2019). Postharvest application of oxalic acid to preserve overall appearance and nutritional quality of fresh-cut green and purple asparagus during cold storage: a combined electrochemical and mass-spectrometry analysis approach. *Postharvest Biology and Technology*, 148, 158-167.
- Barros, L., Pereira, E., Calhella, R.C., Duenas, 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, 1732–1740.

- Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., guru, S.K., Arora, S. (2013). Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32, 216-232.
- Bobbio, P.A., Bobbio, F.O. (1995). Química do processamento de alimentos: pigmentos. 2ª ed., Campinas: Varela, 105-120.
- Bora, D.J., Gupta, A.K., Khan, F.A. (2015). Comparing the performance of L\* a\* b\* and HSV color spaces with respect to color image segmentation. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, 5, 192–203.
- Brietzig, E.G. (2003). Análise comparativa de cápsulas à base de berinjela (*Solanum melongena* L.) e avaliação de sua atividade como interferente em testes laboratoriais in vitro. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.
- Carocho, M., Barros, L., Calhella, R.C., Ćirić, A., Soković, M., Santos-Buelga, C., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R. (2015). *Melissa officinalis* L. decoctions as functional beverages: a bioactive approach and chemical characterization. *Food & Function*, 6, 2240–2248.
- Cheng, C., Zhou, Y., Lin, M., Wei, P., Yang, S.T. (2017). Polymalic acid fermentation by *Aureobasidium pullulans* for malic acid production from soybean hull and soy molasses: Fermentation kinetics and economic analysis. *Bioresource Technology*, 223, 166-174.
- Cheok, C. Y., N. L. Chin, Y. A. Yusof, R. A. Talib, and C. L. Law. (2013). Optimization of Total Monomeric Anthocyanin (TMA) and Total Phenolic Content (TPC) Extractions from Mangosteen (*Garcinia Mangostana* Linn.) Hull Using Ultrasonic Treatments. *Industrial Crops and Products* 50(Supplement C),1-7.
- Colucci, D., Fissore, D., Rosselo, C., Carcel, J.A. (2018). On the effect of ultrasound-assisted atmospheric freeze-drying on the antioxidant properties of eggplant. *Food Research International*, 106, 580-588.
- Das, J., Lahan, J.P., Srivastava, R.B. (2008). *Solanum melongena*: A potential source of antifungal agent. *Indian Journal of Microbiology*, 50, 62-69.
- Das, S., Raychaudhuri, U., Falchi, M., Bertelli, A., Braga P. C., Das, D. K. (2011). Cardioprotective properties of raw and cooked eggplant (*Solanum melongena* L.). *Food & Function*, 2, 395–399.

- Di Sotto, A., Di Giacomo, S., Amatore, D., Locatelli, M., Vitalone, A., Toniolo, C., Rotino, G. L., Lo Scalzo, R., Palamara, A.T., Marcocci, M.E., Nencioni, L. (2018). A Polyphenol Rich Extract from *Solanum melongena* L. DR2 Peel Exhibits Antioxidant Properties and Anti-Herpes Simplex Virus Type 1 Activity In Vitro. *Molecules*, 23, 2066.
- Dranca, F., Oroian, M. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) from eggplant (*Solanum melongena* L.) peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 32, 637–646.
- Evans, B.C., Nelson, C.E., Yu, S.S., Beavers, K.R., Kim, A.J., Li, H., Nelson, H.M., Giorgio, T.D., 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*, e50166.
- FAOSTAT (2017). FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat> (Acedido a 07 de abril de 2019).
- Ferarsa, S., Zhang, W., Moulai-Mostefa, N., Ding, L., Jaffrin, M.Y., Grimi, N. (2018). Recovery of anthocyanins and other phenolic compounds from purple eggplant peels and pulps using ultrasonic-assisted extraction. *Food and Bioproducts Processing*, 109, 19-28.
- Fernandes, F.A.P. (2018). *Ocimum basilicum* var. *purpurascens*: uma fonte de compostos bioativos e pigmentos naturais de interesse para a indústria alimentar. Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e à Universidade de Salamanca para obtenção do Grau de Mestre em Farmácia e Química de Produtos Naturais.
- Fernandes, F., Pereira, E., Prieto, M.A., Calhelha, R.C., Ciric, A., Sokovic, M., Simal-Gandara, J., Barros, L., Ferreira, I.C.R.F. (2019). Optimization of the Extraction Process to Obtain a Colorant Ingredient from Leaves of *Ocimum basilicum* var. *purpurascens*. *Molecules*, 24, 686.
- Food Ingredients Brasil (2009). Dossiê corantes. *Revista-Fi* 9, 40–59.
- Forino, M., Tenore, G. C., Tartaglione, L., Carmela, D. A., Novellino, E., Ciminiello, P. (2015). (1S, 3R, 4S, 5R) 5-*O*-Caffeoylquinic acid: Isolation, stereo-structure characterization and biological activity. *Food Chemistry*, 178, 306–310.
- Francis, F.J. (1989). Food colorants: anthocyanins. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 28, 273-314.

- García-Salas, P., Gómez-Caravaca, A.M., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2014). Identification and quantification of phenolic compounds in diverse cultivars of eggplant grown in different seasons by high-performance liquid chromatography coupled to diode array detector and electrospray-quadrupole-time of flight-mass spectrometry. *Food Research International*, 57, 114-122.
- Gonçalves, L. C. P., Rodrigues, A. C. B., Pagano, A. P. E., Freitas, B. C., Machado, C. O., Nakashima, K. K., Esteves, L. C., Lopes, N. B., Bastos, E. L. (2015). Betalaínas: das Cores das Beterrabas à Fluorescência das Flores. *Revista Virtual de Química*, 7, 292-309.
- Grotewold, E. (2006). The Genetics and Biochemistry of Floral Pigments. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 761-780.
- Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Calhella, R.C., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Queiroz, M.J.R.P., Ferreira, I.C.F.R. (2013). Infusion and decoction of wild German chamomile: Bioactivity and characterization of organic acids and phenolic compounds. *Food Chemistry*, 136, 947-954.
- Gürbüz, N., Uluişik, S., Frarya, A., Frary, A., Doğanlar, S. (2018). Health benefits and bioactive compounds of eggplant. *Food Chemistry*, 268, 602-610.
- Heleno, 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.
- Hong, H., Lee, J.H., Kim, S.K. (2018). Phytochemicals and antioxidant capacity of some tropical edible plants. *Asian-Australas J Anim Sci*, 31, 1677-1684.
- Horincar, G., Enachi, E., Bolea, C., Râpeanu, G., Aprodu, J. (2020). Value-added lager beer enriched with eggplant (*Solanum melongena* L.) peel extract. *Molecules*, 25, 731.
- Im, K., Lee, J.Y., Byeon, H., Hwang, K.W., Kang, W., Whang, W.K., Min, H. (2016). *In Vitro* antioxidative and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of eggplant (*Solanum melongena*) stalks in macrophage RAW 264.7 cells. *Food and agricultural immunology*, 27 (6), 758-771.
- Jabeur, I., Tobaldini, F., Martins, N., Barros, L., Martins, I., Calhella, R.C., Henriques, M., Silva, S., Achour, L., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R. (2016). Bioactive properties and

- functional constituents of *Hypericum androsaemum* L.: A focus on the phenolic profile. *Food Research International*, 89, 422-431
- Jang, S.A., Park, D.W., Kwon, J.E., Song, H.S., Park, B., Jeon, H., Sohn, E.H., Koo, J., Kang, S.C. (2017). Quinic acid inhibits vascular inflammation in TNF- $\alpha$ -stimulated vascular smooth muscle cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 96, 563–571.
- Jiang, T., Mao, Y., Sui, L., Yang, N., Li, S., Zhu, Z., Wang, C., Yin, S., He, J., He, Y. (2018). Degradation of anthocyanins and polymeric color formation during heat treatment of purple sweet potato extract at different pH. *Food Chemistry*, 274, 460–470.
- Jiménez, L. C., 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.
- Jung, E.J., Bae, M.S., Jo, E.K., Jo, Y.H., Lee, S.C. (2011). Antioxidant activity of different parts of eggplant. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 4610–4615.
- Kakkar, S., Bais, S. (2014) A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. *ISRN Pharmacol*, v. 2014, p. 1-9.
- Karam, J., Bibiloni M.M., Pons, A., Tur, J.A. (2019). Total fat and fatty acid intakes and food sources in Mediterranean older adults requires education to improve health. *Nutrition Research*, 67, 67-74.
- Kandoliya, U.K., Bajaniya, V.K., Bhadja, N.K., Bodar, N.P., Golakiya, B.A. (2015). Antioxidant and Nutritional components of Eggplant (*Solanum melongena* L.) Fruit Grown in Saurashtra Region. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4, 806-813.
- Kaume, L., Howard, L. R., Devareddy, L. (2012). The Blackberry Fruit: A Review on Its Composition and Chemistry, Metabolism and Bioavailability, and Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 5716-5727.
- Kayashima, T., Katayama, T. (2002). Oxalic acid is available as a natural antioxidant in some systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1573, 1–3.
- Kazemi, M., khodaiyan, F., Hosseini, S.S., Najari, Z. (2019). An integrated valorization of industrial waste of eggplant: Simultaneous recovery of pectin, phenolics and sequential production of pullulan. *Waste Management*, 100, 101-111.

- Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F., Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64, 923–933.
- Lao, F. e Giusti, M. (2017) The effect of pigment matrix, temperature and amount of carrier on the yield and final color properties of spray dried purple corn (*Zea Mays* L.) cob anthocyanin powder. *Food Chemistry*, 227, 376-382.
- Lee, D.Y., Park, Y.J., Hwang, S.C., Kim, K.D., Moon, D.Y., Kim, D.H. (2018). Cytotoxic effects of delphinidin in human osteosarcoma cells. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*, 52, 58-64.
- Lima-Corrêa, R. de A.B., Andrade, M. dos S., Da Silva, M.F. das G.F., Freire, J. T., Ferreira, M. do C. (2017). Thin-layer and vibrofluidized drying of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.): analysis of drying homogeneity and influence of drying conditions on the composition of essential oil and leaf colour. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 7, 54-63.
- Lockowandt, L., Pinela, J., Roriz, C.L., Pereira, C., Abreu, R.M.V., Calhella, R.C., Alves, M.J., Barros, L., Bredol, M., Ferreira, I.C.F.R. (2019). Chemical features and bioactivities of cornflower (*Centaurea cyanus* L.) capitula: The blue flowers and the unexplored non-edible part. *Industrial Crops and Products*, 128, 496-503.
- Lopes, T.J., Xavier, M.F., Quadri, M.G.N, Quadri, M.B. (2007). Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. *R. Bras. Agrociência, Pelotas*, 13, 3, 291-297.
- López, C. J. (2017). Desarrollo de un aditivo colorante natural a base de cianidina obtenido a partir de frutos de *Arbutus unedo* L.: optimización de la extracción y estudio de su aplicación en gofres. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança para obtenção do grau de mestre em farmácia e química de produtos naturais.
- Malacrida, C.S., Motta, S. (2006). Antocianinas em suco de uva: composição de estabilidade. *B. CEPPA, Curitiba*, 24, 1, 59-82.
- Mazza, G., Cacace, J.E., Kay, C.D. (2004). Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids. *Journal of AOAC International*, 87, 129–145.
- Melgar, B., Dias, M. I., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., Garcia-Castello, E. M., & Rodriguez-Lopez, A. D. (2019). Ultrasound and Microwave Assisted Extraction of Opuntia Fruit Peels Biocompounds: Optimization and Comparison Using RSM-CCD. *Molecules*, 24, 3618

- Meregalli, M.M. (2017). Estudo comparativo de diferentes métodos de extração de compostos bioativos da casca do araçá vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine). Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Brasil.
- 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, 327–335.
- Muangrat, R., Pongsirikul, I., & Blanco, P. H. (2018). Ultrasound assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds from dried cob of purple waxy corn using response surface methodology. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42, 1–11.
- Niño-Medina, G., Urías-Orona, V., Muiy-Rangel, M.D., Heredia, J.B. (2017). Structure and content of phenolics in eggplant (*Solanum melongena*) - a review. *South African Journal of Botany*, 111, 161-169.
- Nemzer, B., Vargas, L., Xia, X., Sintara, M., Feng, H. (2018). Phytochemical and physical properties of blueberries, tart cherries, strawberries, and cranberries as affected by different drying methods. *Food Chemistry*, 262, 242-250.
- Nisha, P., Nazar, P.A., Jayamurthy, P. (2009). A comparative study on antioxidant activities of different varieties of *Solanum melongena*. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2640-2644.
- Noda, Y., Kneyuki, T., Igarashi, K, Mori, A., Packer, L. (2000). Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant peels. *Toxicology*, 148, 119-123.
- Nogueira, N. M., Soares, B. T. M., Andrade, A. B. N., Singh, A. K. (2011). Méritos comparativos da Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência em escala convencional e miniaturizada. *Revista Brasileira de Farmácia*, 92, 44-50.
- Okumura, F., Soares, M.H.F.B., Cavalheiro, E.T.G. (2002). Identificação de pigmentos naturais de espécies vegetais utilizando-se cromatografia em papel. *Química Nova*, 25, 4, 680-683.
- Park, S. H., Min, T. S. (2006). Caffeic acid phenethyl ester ameliorates changes in IGFs secretion and gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*, 78, 1741- 1747.
- Pereira, E., Barros, L., Martins, A., Ferreira, I. C. F. R. (2012). Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats. *Food Chemistry*, 130, 394–403.

- Prabhu, K.H., Bhute, A.S. (2012). Plant based natural dyes and mordants: A Review. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 2, 649-664.
- Prado, M.A., Godoy, H.T. (2003). Corantes artificiais em alimentos. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 14, 2, 237-250.
- Raigón, M.D., Prohens, J., Muñoz-Falcón, J.E., Nuez, F. (2008). Comparison of eggplant landraces and commercial varieties for fruit content of phenolics, minerals, dry matter and protein. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 370-376.
- Receita de bolo. Consultado a 14 de dezembro de 2019, de Tudo Gostoso. Disponível em <https://www.tudogostoso.com.br/receita/141724-bolo-quase-nada-sem-leite-e-sem-ovo.html>.
- Rodriguez-Amaya, D.B. (2016). Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science*, 7, 20-26.
- Rodriguez-Jimenez, J.R., Amaya-Guerra, C.A., Baez-Gonzalez, J.G., Aguilera-Gonzalez, C., Urias-Orona, V., Nino-Medina, G. (2018). Physicochemical, Functional, and Nutraceutical Properties of Eggplant Flours Obtained by Different Drying Methods. *Molecules*, 23, 3210.
- 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.
- Russo, P., Adiletta, G., Di Matteo, M. (2013). The influence of drying air temperature on the physical properties of dried and rehydrated eggplant. *Food and Bioproducts Processing*, 91, 249-256.
- Salerno, L., Modica, M.N., Pittalà, V., Romeo, G., Siracusa, M.A., Di Giacomo, C., Sorrenti, V., Acquaviva, R. (2014). Antioxidant activity and phenolic content of microwave-assisted *Solanum melongena* extracts. *The Scientific World Journal*, v. 2014, ID 719486, 6 p.
- Scientia Chromatographica (2016). Instituto Internacional de Cromatografia, 8, 4, 257-267.
- Song, S.E., Jo, H.J., Kim, Y.W., Cho, Y.J., Kim, J.R., Park, S.Y. (2016). Delphinidin prevents high glucose-induced cell proliferation and collagen synthesis by inhibition of NOX-1 and mitochondrial superoxide in mesangial cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 130, 235-243.

- Soković, M., van Griensven, L.J.L.D. (2006). Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *European Journal of Plant Pathology*, 116, 211–224.
- Soković, M., Glamočlija, J., Marin, M.D., Brkić, D., van Griensven, L.J.L.D. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*, 15, 7532–7546.
- Taher, D., Solberg, S.Ø., Prohens, J., Chou, Y., Rakha, M., Wu, T. (2017). World Vegetable Center Eggplant Collection: Origin, Composition, Seed Dissemination and Utilization in Breeding. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1484.
- 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, 606–610.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54, 733-749.
- Taofiq, O., Corrêa, R. C. G., Barros, L., Prieto, M. A., Bracht, A., Peralta, R. M., ... Ferreira, I. C. F. R. (2019). A comparative study between conventional and non-conventional extraction techniques for the recovery of ergosterol from *Agaricus blazei* Murrill. *Food Research International*, 125, 108541.
- Terci, D.B.L., Rossi A.V. (2002). Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução? *Química Nova*, 25, 4.
- Todaro, A., Cimino, F., Rapisarda, P., Catalano, A.E., Barbagallo, R.N., Spagna, G. (2009). Recovery of anthocyanins from eggplant peel. *Food Chemistry*, 114, 434–439.
- USDA (United States Department of Agriculture Agricultural Research Service), relatório 11209, beringela crua. Disponível em: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2962>, acessado em 17 de abril de 2019.
- Veloso, L.A. (2012). Dossiê técnico: Corantes e pigmentos. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas – SBRT, Instituto de Tecnologia do Paraná. Disponível em: <http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NTcwOA==>, acessado em 19 de abril de 2019.

- Vieira, G.S. (2015). Estudo dos processos de extração de Antocianinas da polpa de juçara (*Euterpe edulis Mart.*) e da concentração do extrato por nanofiltração. Tese (Doutoramento em Engenharia de Alimentos), UNICAMP, Campinas.
- Wang, W., Lai, T., Qin, G., Tian, S. (2009). Response of Jujube Fruits to Exogenous Oxalic Acid Treatment Based on Proteomic Analysis. *Plant and Cell Physiology*, 50, 230-242.
- 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.
- Weber, F., Boch, K. Scheber, A. (2017). Influence of copigmentation on the stability of spray dried anthocyanins from blackberry. *LWT – Food Science Technology*, 75, 72-77.
- Wu, X., Prior, R.L. (2005). Identification and characterization of anthocyanins by highperformance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts, and grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 3101–3113.
- Xie, L., Su, H., Sun, C., Zheng, X., Chen, W. (2018). Recent advances in understanding the anti-obesity activity of anthocyanins and their biosynthesis in microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*, 72, 13-24.
- Xu, M., Du, C., Zhang, N., Shi, X., Wu, Z., Qiao, Y. (2016). Color spaces of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) for quality assessment. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*, 3, 168-175.
- 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.