



***Ocimum basilicum* var. *purpurascens*: uma fonte de compostos
bioativos e pigmentos naturais de interesse para a indústria
alimentar**

Filipa Alexandra Pires Fernandes

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

Orientado por:

Professora Doutora Isabel C.F.R. Ferreira

Doutora Lillian Barros

Bragança

2018

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



Agradecimentos

Devemos reconhecer o bem que nos fazem agradecendo. Hoje quero dizer muito obrigada a todos aqueles que estiveram envolvidos na realização desta dissertação, pelo seu apoio, dedicação e ajuda.

Em primeiro lugar gostava de agradecer à **Professora Doutora Isabel Ferreira** por me ter dado a oportunidade de trabalhar com uma profissional de excelência e com o seu admirável grupo. Também por confiar em mim e no meu trabalho, desde o início do mestrado, demonstrando-se sempre disponível para me ajudar e orientar no desenvolvimento da minha dissertação. A si um muito obrigada.

À **Doutora Lillian Barros**, pela sua simpatia, orientação, tempo dedicado a esta dissertação e, acima de tudo, pelos conhecimentos que me transmitiu. Obrigada pela referência que se tornou para mim.

À **Doutora Eliana Pereira**, a si dizer obrigada é pouco, a verdade é que a sua ajuda foi imprescindível para a realização do meu trabalho. Aprendi muito consigo, foi das pessoas que mais me ajudou, valorizando sempre o meu trabalho. Mesmo eu sendo “chatinha” ou escrevendo comentários como se fossem “cartas para o pai natal” nunca desistiu de mim. Obrigada pela simpatia, carinho, amizade, paciência, e por todos os conselhos que me deu, para mim é um exemplo que quero seguir. Do fundo do meu coração, obrigada.

Ao **Doutor Miguel A. Prieto**, por toda a sua disponibilidade, simpatia e ajuda na realização desta dissertação. Obrigada pelo seu tempo.

A todo o grupo **BioChemCore**, por me terem recebido tão bem, integrando-me da melhor forma no grupo. Poderia destacar algumas pessoas, porém todos tiveram um papel fundamental nesta etapa. Obrigada por me mostrarem a importância do companheirismo e da boa disposição no trabalho.

Ao **Centro D. Abílio**, a instituição que me acolheu à catorze anos. À **Irmã Estela**, por todo o apoio e ajuda ao longo destes anos, sem dúvida que é um pilar. Durante o meu percurso académico sempre acreditou em mim e nas minhas capacidades, sem o seu apoio não teria chegado até aqui. Obrigada, vou sempre ser-lhe grata.

Aos **meus irmãos e pais**, principalmente à **Fátima**. Obrigada Fátima e Sérgio por todas as vezes que me acolheram, me ouviram, me apoiaram e me deram o amor mais importante que há na vida, o da família. Obrigada, pelos valores transmitidos.

A ti **Paulo Batouxas**, muito obrigada pelo apoio fundamental que sempre me deste e por me mostrares que afinal eu consigo.

Às minhas irmãs de coração **Bianca, Mila e Telma**, a vocês sou grata por estes anos de amizade verdadeira.

À **Cristina e Filipa Mandim**, obrigada pelo companheirismo destes anos, que entre cafés, saídas e passeios cresceu uma amizade que espero levar para a vida. Obrigada a vocês pelo carinho.

Não poderia deixar de agradecer ao **Centro de Investigação de Montanha**, ao **Instituto Politécnico de Bragança** e à **Universidade de Salamanca** por permitirem o desenvolvimento deste trabalho e pelos momentos de aprendizagem que me proporcionaram.

Como nunca é de mais agradecer, mais uma vez o meu muito obrigada a todos.

Abreviaturas

a^*	Cromaticidade vermelho/verde
A	Antocianinas
a.C.	Antes de cristo
A_{DPPH}	Absorvância da solução de DPPH
AH	Antioxidantes doadores de hidrogénio
AOAC	Associação oficial de químicos analíticos
A_s	Absorvância da solução na presença de extrato
b^*	Cromaticidade azul/amarelo
b_0	Coefficiente constante
b_i	Coefficiente de efeito linear
b_{ij}	Coefficiente de efeito de interação
b_{ii}	Coefficiente de efeito quadrático
BHT	Hidroxitolueno butilado
CA	Compostos antociânicos
DCCC	Desenho composto central circunscrito
CIE	“Commission Internationale de l’Eclairage”
CMB	Concentração mínima bactericida
CMF	Concentração mínima fungicida
CMI	Concentração mínima inibitória
d.i.	Diâmetro interno
DAD	Detetor de díodos
DDA	Dose diária admissível
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
E	Extrato
EC_{50}	Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

Eq.	Equação
ESI	Fonte de ionização por espalhamento de elétrons
E/S	Relação enzima/substrato
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FAME	Éster metílico de ácidos gordos
FBS	Soro fetal bovino
FDA	Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos
FID	Detetor de ionização de chama
<i>g</i>	Força <i>g</i> (unidade de rotação)
GC	Cromatografia gasosa
GI ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
HAE	Extração assistida por calor
HBSS	Solução salina equilibrada de Hank
HCA	Análise hierárquica de cluster
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-FL	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de fluorescência
HPLC-RI	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração
INT	Cloreto de <i>p</i> -iodonitrotetrazólio
IR	Infravermelho
<i>L</i> *	Luminosidade
LC	Cromatografia Líquida
<i>m</i>	Declive
MA	Agar de malte
mf	Massa fresca
MH	Müeller Hinton
MO	Missouri
MS	Espectrometria de massa
MS ²	Segunda fase da espectrometria de massa
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados
ms	Massa seca
<i>m/v</i>	Razão massa/volume

<i>m/z</i>	Razão massa/carga
<i>n</i>	Número de variáveis
n.d.	Autor não identificado
ns	Não significativo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PI	Padrão interno
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
<i>R</i>	Rendimento
<i>R</i> ²	Coefficiente de determinação
RF	Resíduo fresco
RNS	Espécie Reativa de Azoto
ROS	Espécie Reativa de Oxigénio
ROOH	Composto orgânico oxidado
RPMI-1640	Meio Roswell Park Memorial Institute
RSA	Atividade Captadora de Radicais
MSR	Metodologia de superfície de resposta
RSS	Espécie Reativa de Enxofre
<i>S</i> ou <i>X</i> ₃	Variável de percentagem de etanol no solvente
<i>S/L</i>	Razão sólido líquido
SC	Carolina do Sul
SFA	Ácidos gordos saturados
SRB	Sulforrodamina B
<i>t</i> ou <i>X</i> ₁	Variável de tempo
<i>T</i> ou <i>X</i> ₂	Variável de temperatura
TCA	Total compostos antociânicos
TFA	Ácido trifluoroacético
Tr	Tempo de retenção
TSB	Caldo de soja tríplico
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UE	União Europeia
UFC	Unidade formadora de colónias
UFLC-DAD	Cromatografia líquida ultra rápida acoplada a um detetor de díodos

UT	Utah
UV	Radiação ultravioleta
UV-VIS	Radiação ultravioleta-visível
v/v	Volume/volume
X	Variável independente
Y	Variável dependente
λ_{\max}	Comprimento de onda de absorção máxima

Índice

Agradecimentos	iii
Abreviaturas	v
Índice de Figuras	xii
Índice de Tabelas	xiv
Índice de Equações	xvi
Resumo	xvii
Resumen	xx
Abstract	xxiii
1. Introdução.....	1
1.1. Caracterização de <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i>	3
1.1.1. História, benefícios e precauções.....	4
1.1.2. Composição química	5
1.2. Antocianinas e suas aplicações como pigmentos naturais.....	7
1.2.1. Aspectos químicos e propriedades das antocianinas	8
1.2.2. Métodos de extração e estabilização.....	11
1.3. Utilização de corantes naturais na indústria alimentar	15
1.3.1. Corantes naturais vs corantes artificiais.....	19
1.3.2. Utilização de antocianinas	27
2. Objetivos.....	29
3. Material e Métodos	32
3.1. Amostra	33
3.2. Padrões e Reagentes	33
3.2.1. Para a análise química e nutricional	33
3.2.2. Para o estudo das bioatividades	34
3.3. Determinação da cor	35
3.4. Determinação do valor nutricional e composição química	35
3.4.1. Valor nutricional.....	35
3.4.2. Composição química	36
3.4.2.1. Açúcares.....	36
3.4.2.2. Ácidos orgânicos.....	37
3.4.2.3. Tocoferóis	38
3.4.2.4. Ácidos Gordos.....	39

3.4.2.5.	Determinação do perfil de compostos fenólicos	40
3.4.2.5.1.	Compostos fenólicos não-antociânicos	40
3.4.2.5.2.	Compostos fenólicos antociânicos	41
3.5.	Avaliação do potencial bioativo.....	43
3.5.1.	Preparação do extrato hidroetanólico.....	43
3.5.2.	Atividade antioxidante.....	43
3.5.2.1.	Atividade captadora de radicais livres (DPPH).....	43
3.5.2.2.	Poder redutor.....	45
3.5.2.3.	Inibição da descoloração do β -caroteno	46
3.5.3.	Atividade antimicrobiana.....	48
3.5.3.1.	Atividade antibacteriana.....	48
3.5.3.2.	Atividade antifúngica	49
3.5.4.	Avaliação da citotoxicidade em linhas celulares tumorais	50
3.5.5.	Avaliação da hepatotoxicidade em células não tumorais.....	52
3.6.	Otimização do processo de obtenção de um corante à base de antocianinas das folhas de <i>O. basilicum</i> var. <i>purpurascens</i>	52
3.6.1.	Extração assistida por calor (HAE)	52
3.6.2.	Preparação dos extratos obtidos por HAE	53
3.6.3.	Identificação e quantificação de compostos antociânicos através de um sistema de HPLC-DAD-ESI/MS.....	54
3.6.4.	Formato dos valores de resposta para processos analíticos	54
3.6.5.	Desenho experimental, análise de modelos e avaliação estatística.....	54
3.6.5.1.	Desenho experimental MSR.....	54
3.6.5.2.	Modelo Matemático	55
3.6.5.3.	Procedimento de otimização das variáveis de forma a maximizar a resposta	55
3.6.5.4.	Análise de cluster	56
3.6.5.5.	Análise dose-resposta da relação sólido-líquido	56
3.6.6.	Métodos numéricos, análise estatística e ilustrações gráficas.....	56
3.7.	Preparação do extrato rico em compostos antociânicos obtido nas condições ótimas a partir das folhas de <i>O. basilicum</i> var. <i>purpurascens</i>	57
3.8.	Avaliação do potencial corante do extrato rico em compostos antociânicos obtido nas condições ótimas a partir das folhas de <i>O. basilicum</i> var. <i>purpurascens</i>	58
3.9.	Avaliação das propriedades bioativas do extrato rico em compostos antociânicos obtido nas condições ótimas a partir das folhas de <i>O. basilicum</i> var. <i>purpurascens</i>	58
3.9.1.	Atividade antioxidante.....	58
3.9.2.	Atividade antimicrobiana.....	59
3.9.3.	Atividade citotóxica e hepatotóxica.....	59
4.	Resultados e Discussão	60
4.1.	Avaliação da cor nas folhas de <i>O. basilicum</i> var. <i>purpurascens</i>	61
4.2.	Caracterização nutricional das folhas de <i>O. basilicum</i> var. <i>purpurascens</i>	62

4.3.	Composição química das folhas de <i>O. basilicum</i> var. <i>purpurascens</i>	64
4.3.1.	Perfil em açúcares, ácidos orgânicos, tocoferóis e ácidos gordos.....	64
4.3.2.	Perfil em compostos fenólicos não antociânicos e antociânicos.....	68
4.4.	Atividade antioxidante, antimicrobiana, citotóxica e hepatotóxica do extrato hidroetanólico obtido a partir das folhas de <i>O. basilicum</i> var. <i>purpurascens</i>	72
4.5.	Otimização do processo de obtenção de um extrato corante à base de antocianinas a partir das folhas de <i>O. basilicum</i> var. <i>purpurascens</i>	76
4.5.1.	Critérios de resposta para a análise de MSR.....	76
4.5.2.	Modelos de superfície de resposta teórica	79
4.5.3.	Efeito das variáveis independentes nas respostas e condições ótimas de extração.....	84
4.5.4.	Agrupamento dos compostos antociânicos de acordo com as condições de HAE que maximizam a sua extração	88
4.5.5.	Análise dose-resposta do efeito sólido-líquido nas condições ótimas	90
4.6.	Avaliação do potencial corante do extrato rico em antocianinas obtido das folhas de <i>O. basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> pelo processo de extração otimizado	91
4.7.	Avaliação das propriedades bioativas do extrato rico em antocianinas obtido das folhas de <i>O. basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> pelo processo de extração otimizado.....	92
5.	Considerações finais.....	96
6.	Referências bibliográficas	99

Índice de Figuras

Figura 1. Manjeriço (A) e manjeriço vermelho rubi (B).....	3
Figura 2. Estrutura química de antocianinas.....	7
Figura 3. Estrutura molecular dos flavonoides.	8
Figura 4. Matrizes naturais ricas em antocianinas.....	11
Figura 5. Corantes alimentares.	20
Figura 6. Estrutura química da malveína.	22
Figura 7. Estrutura química da tartarazina (A) e do amaranço (B).	23
Figura 8. Estrutura química do amarelo quinoleína.....	24
Figura 9. Estrutura química de azul brilhante.....	24
Figura 10. Estrutura química de eritrosina.....	25
Figura 11. Cor das antocianinas dependendo do pH.	27
Figura 12. Esquematização do trabalho realizado na presente dissertação.	31
Figura 13. A- Amostra fresca; B- Amostra Seca; C- Amostra reduzida a pó.....	33
Figura 14. Extração por soxhlet.....	36
Figura 15. Processo de lavagem da fração aquosa.....	37
Figura 16. Secagem dos extratos sob fluxo de azoto.....	39
Figura 17. Etapas do processo de extração: A) filtração; B) evaporação e C) extrato liofilizado.	42
Figura 18. Determinação da atividade captadora de radicais livres.	44
Figura 19. Processo de captação de radicais livres.	45
Figura 20. Exemplo de uma microplaca na parte final do ensaio do poder redutor. ..	46
Figura 21. Ensaio de inibição da descoloração de β -caroteno.....	47
Figura 22. Ensaio de citotoxicidade.....	51
Figura 23. HAE de compostos antociânicos.....	53

Figura 24. Ilustração do processamento da amostra após extração por HAE.....	54
Figura 25. Extrato rico em compostos antociânicos (após liofilização).....	58
Figura 26. Perfil de compostos fenólicos de extratos hidroetanólicos de <i>O. basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> registados a 280 nm (A) e 520 nm (B).....	72
Figura 27. Diagrama das diferentes etapas executadas para otimizar as condições que maximizam as respostas de extração dos compostos antociânicos (mg/g E) e do resíduo total extraído (<i>Rendimento</i> , %).	79
Figura 28. Ilustração dos resultados gráficos do método de superfície de resposta do rendimento de extração e compostos antociânicos maioritários e totais.	85
Figura 29. Resposta gráfica em 2D dos efeitos das variáveis independentes na extração de compostos antociânicos das folhas de manjerição vermelho rubi.	87
Figura 30. Dendrograma de HCA de compostos antociânicos de acordo com as condições de HAE que maximizam a sua extração a partir das folhas de manjerição vermelho rubi.	88

Índice de Tabelas

Tabela 1. Compostos fenólicos presentes em <i>O. basilicum</i> L. e em <i>O. basilicum</i> var. <i>purpurascens</i>	6
Tabela 2. Antocianinas mais comuns nas plantas.	10
Tabela 3. Técnicas de extração de antocianinas.	12
Tabela 4. Exemplos de corantes naturais e respectivas aplicações na indústria alimentar.	19
Tabela 5. Classificação química dos corantes naturais.	21
Tabela 6. Exemplos de corantes artificiais e respectivas aplicações na indústria alimentar.	26
Tabela 7. Delineamento experimental e codificação das variáveis independentes usadas no desenho fatorial CCCD com 5 níveis.....	55
Tabela 8. Parâmetros físicos (cor - CIE $L^* a^* b^*$) de <i>O. basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> (média \pm DP).....	61
Tabela 9. Parâmetros nutricionais das folhas de <i>O. basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> (média \pm DP).....	63
Tabela 10. Composição em açúcares, ácidos orgânicos, tocoferóis e ácidos gordos das folhas de <i>O. basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> (média \pm DP).....	68
Tabela 11. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima na região de UV-Vis (λ_{max}), tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos no extrato hidroetanólico de <i>O. basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> (média \pm DP).	71
Tabela 12. Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de <i>O. basilicum</i> var. <i>purpurascens</i>	73

Tabela 13. Atividade antibacteriana (CMI e CMB mg/mL) e antifúngica (CMI e CMF mg/mL) do extrato hidroetanólico de <i>O. basilicum</i> var. <i>purpurascens</i>	75
Tabela 14. Atividade citotóxica e hepatotóxica do extrato hidroetanólico de <i>O. basilicum</i> var. <i>purpurascens</i>	76
Tabela 15. Delineamento experimental (variáveis independentes e os seus valores codificados e naturais), valores para compostos antociânicos (mg/g E) e rendimento de extração (%) obtidos nas 28 execuções envolvidas na otimização da extração de HAE por MSR.....	78
Tabela 16. Coeficientes de ajuste e R^2 determinados para os modelos obtidos para compostos antociânicos individuais e agrupados, rendimento de extração (Tabela 15) e condições ótimas de HAE e valores de resposta.....	81
Tabela 17. Modelos matemáticos do processo de extração derivados do modelo polinomial de segunda ordem com interações da Equação 6.	83
Tabela 18. Valores máximos de resposta de cada composto antociânico e seus valores nas condições ótimas de processamento restantes compostos apresentados na Tabela 16.....	89
Tabela 19. Quantidade de antocianinas (derivados de cianidina e pelargonidina) no extrato corante e os seus parâmetros de cor nas condições ótimas (média \pm DP).	91
Tabela 20. Atividade antioxidante do extrato corante rico em antocianinas obtido nas condições ótimas de extração (média \pm DP).....	92
Tabela 21. Atividade antibacteriana (CMI e CMB mg/mL) e antifúngica (CMI e CMF mg/mL) do extrato corante rico em antocianinas obtido nas condições ótimas de extração.	94
Tabela 22. Atividade citotóxica e hepatotóxica do extrato corante rico em antocianinas obtido nas condições ótimas de extração (média \pm DP).	95

Índice de Equações

Equação 1. Equação para determinar a energia total.	36
Equação 2. Equação para determinação de RSA no método DPPH.....	44
Equação 3. Equações químicas do ensaio do poder redutor.	46
Equação 4. Equação do ensaio de inibição da descoloração do β -caroteno.	47
Equação 5. Equações químicas do ensaio de β -caroteno.....	48
Equação 6. Equação polinomial de segunda ordem.	55

Resumo

O reino *plantae* abrange uma vasta diversidade de espécies e nos últimos anos tem sido alvo de diversos estudos, devido à sua composição em nutrientes e moléculas de elevado interesse, tanto para a indústria alimentar como farmacêutica. Visualmente, a diferenciação das plantas recai sobre a sua cor, particularmente na concentração em pigmentos naturais presente nas folhas, como por exemplo: clorofilas, carotenoides, antocianinas, betalaínas, entre outros. Devido à crescente preocupação dos consumidores sobre os efeitos colaterais associados aos corantes artificiais, a indústria alimentar tem investido na substituição destes aditivos por moléculas corantes naturais, que podem ser obtidas a partir de diversas matrizes vegetais.

A variedade *Ocimum basilicum* var. *purpurascens*, conhecida popularmente por manjeriço vermelho rubi, pertence ao género *Ocimum* e a sua cor púrpura resulta da elevada concentração em compostos antociânicos. Esta variedade tem manifestado ação terapêutica, nomeadamente, propriedades diuréticas, anti-inflamatórias e antiespasmódicas.

Este trabalho teve como objetivo aprofundar os conhecimentos relativamente a esta variedade, através da caracterização de parâmetros físicos (cor), nutricionais (teor em humidade, cinzas, proteínas, gorduras, hidratos de carbono e energia) e químicos (açúcares livres, ácidos orgânicos, tocoferóis e ácidos gordos) das folhas; seguido da avaliação do conteúdo em compostos fenólicos e do potencial bioativo (atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e citotoxicidade) do seu extrato hidroetanólico. Foi ainda efetuado a otimização do processo de extração de antocianinas, através de uma técnica de extração assistida por calor (HAE), aplicando o método de análise de superfície de resposta. Ao extrato rico em compostos antociânicos, obtido no final do processo de otimização, foi avaliado o poder corante, através da medição da cor e quantificação dos pigmentos no extrato. Este foi ainda avaliado quanto ao potencial bioativo, através dos ensaios acima referidos.

O perfil nutricional foi avaliado utilizando metodologias oficiais de análise de produtos alimentares (AOAC), evidenciando-se os hidratos de carbono, como os macronutrientes presentes em maior quantidade, contrariamente à fração lipídica que surgiu em menor quantidade.

A nível químico, a quantificação dos açúcares livres foi feita através de um sistema de HPLC-RI, os ácidos orgânicos por UFLC-DAD, os tocoferóis por HPLC-fluorescência

e os ácidos gordos por GC-FID. As amostras revelaram a presença de vários compostos de interesse, nomeadamente quatro moléculas de açúcares livres e sete ácidos orgânicos, destacando-se a glucose e o ácido quínico, respetivamente. Relativamente ao teor em tocoferóis, foram detetadas as isoformas α -, β -, γ - e δ -tocoferol, sendo o γ -tocoferol o mais abundante. No que concerne ao perfil de ácidos gordos, foram identificados vinte compostos, destacando-se o ácido α -linolénico (C18:3n3) como maioritário.

A determinação do perfil fenólico foi realizada através de um sistema de HPLC-DAD-ESI/MS, evidenciando a presença de 26 compostos fenólicos, dos quais 13 foram identificados como compostos fenólicos não antociânicos, destacando-se o ácido rosmarínico como composto maioritário e 13 compostos antociânicos, no qual a cianidina-3-(6,6'-di-*p*-cumaroil)-soforósido-5-glucósido foi o composto mais abundante.

Nos ensaios de bioatividade, o potencial antioxidante foi avaliado através de três ensaios *in vitro* (atividade captadora de radicais DPPH, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica medido através da descoloração do β -caroteno), verificando-se resultados promissores no extrato hidroetanólico estudado, sobressaindo no ensaio da atividade captadora de radicais DPPH com os valores de EC₅₀ mais baixos (melhor potencial antioxidante). A atividade antimicrobiana foi analisada através do método de microdiluição em bactérias Gram-positivo e Gram-negativo e em fungos, tendo-se alcançado resultados satisfatórios para a maioria das bactérias e fungos testados. Na avaliação da citotoxicidade, foram usadas várias linhas celulares tumorais (HepG2, NCI-H460, MCF-7 e HeLa) e a uma cultura de células primária não tumoral (PLP2), aplicando o ensaio da sulforrodamina B. Os resultados demonstraram a ausência de capacidade anti-proliferativa em todas as linhas testadas, contudo, também foi evidente a ausência de toxicidade do extrato na cultura de células primárias testada – PLP2.

Tendo em conta o procedimento de otimização da extração para a obtenção de um extrato rico em antocianinas, a extração assistida por calor revelou a obtenção de $114,74 \pm 0,58$ mg de antocianinas por g de extrato, quando se aplicaram as variáveis $t = 65,37 \pm 3,62$ min, $T = 85,00 \pm 1,17$ °C e $S = 62,50 \pm 4,24$ %. O procedimento e as condições otimizadas neste trabalho triplicaram o teor total de antocianinas obtidas, usando o método convencional, dando origem à importância da otimização de um procedimento de extração. Para além dos aspetos químicos, o extrato ótimo rico em antocianinas foi

analisado tendo em conta parâmetros físicos (cor), e os resultados evidenciaram uma melhoria significativa da cor púrpura, comparativamente com as folhas frescas e ao pó liofilizado das folhas secas do manjeriço vermelho rubi. Este extrato também foi avaliado quanto às suas propriedades bioativas, sendo que a atividade antioxidante do extrato otimizado revelou um potencial menor ou muito semelhante ao extrato obtido pelo método convencional. No entanto, revelou resultados muito promissores quanto ao efeito citotóxico e antimicrobiano.

Assim, *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* demonstrou ser uma variedade rica em compostos bioativos, que podem ser aplicados na indústria alimentar e farmacêutica de forma a substituir moléculas artificiais, acrescentando valor às matrizes de incorporação.

Resumen

El reino *plantae* abarca una amplia diversidad de especies y, en los últimos años, han sido objeto de diversos estudios, debido a su composición en nutrientes y moléculas de alto interés, tanto para la industria alimentaria como farmacéutica. En general, la diferenciación de las plantas recae sobre su color, particularmente en la concentración en pigmentos naturales presente en las hojas (como por ejemplo clorofilas, carotenoides, antocianinas y betalaínas). Debido a la creciente preocupación de los consumidores sobre los efectos colaterales que los colorantes sintéticos acarrearán, la industria alimentaria está invirtiendo en la sustitución de estos aditivos por pigmentos naturales, obtenidos a partir de matrices vegetales.

La variedad *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* (popularmente conocido como albahaca roja rubí) pertenece al género *Ocimum* y su característico color púrpura, resulta de la elevada concentración en compuestos antociánicos. Esta variedad ha demostrado una acción terapéutica, en particular, propiedades diuréticas, anti-inflamatorias y antiespasmódicas.

Este trabajo tuvo como objetivo profundizar los conocimientos sobre esta variedad, a través de la caracterización de los parámetros físicos (color), nutricionales (contenido en humedad, cenizas, proteínas, grasas, hidratos de carbono y energía) y químicos (azúcares libres, ácidos orgánicos, tocoferoles y ácidos grasos); seguido de la evaluación del contenido en compuestos fenólicos y del potencial bioactivo (actividad antioxidante, citotoxicidad y actividad antimicrobiana) de un extracto hidroetanólico. Se estudió también la optimización del proceso de extracción de antocianinas a través de una técnica de maceración - HAE, aplicando el método de análisis de superficie de respuesta. Al extracto rico en compuestos antociánicos, obtenido al final del proceso, se realizó la evaluación bioactiva, a través de los ensayos arriba mencionados.

El perfil nutricional fue evaluado utilizando las metodologías oficiales de análisis de alimentos (AOAC), evidenciando el contenido en hidratos de carbono, como el macronutriente presente en mayor cantidad, contrariamente a la fracción lipídica que apareció en menor cantidad.

A nivel químico, la cuantificación de los azúcares libres fue realizada a través de un sistema de HPLC-RI, los ácidos orgánicos por UFLC-DAD, los tocoferoles por HPLC-fluorescencia y los ácidos grasos por GC-FID. Las muestras revelaron la presencia de

varios compuestos de interés, en particular cuatro moléculas de azúcares libres y siete ácidos orgánicos, destacándose la glucosa y el ácido quínico, respectivamente. En cuanto al contenido de tocoferoles, se detectaron las isoformas α -, β -, γ - y δ -tocoferol, siendo el γ -tocoferol el más abundante. En lo que concierne al perfil de ácidos grasos, se identificaron veinte compuestos, destacándose el ácido α -linolénico (C18:3n3) como mayoritario.

La determinación del perfil fenólico fue realizada a través de un sistema de HPLC-DAD-ESI/MS, evidenciando la presencia de 26 compuestos fenólicos, de los cuales 13 fueron identificados como compuestos fenólicos no-antociánicos (destacándose el ácido rosmarínico como compuesto mayoritario) y 13 compuestos antociánicos, dónde la cianidina-3- (6,6'-di-*p*-cumaroil) -soforosil-5-glucósido fue el compuesto más abundante.

En los ensayos de bioactividad, el potencial antioxidante fue evaluado a través de tres ensayos *in vitro* (actividad captadora de radicales DPPH, poder reductor e inhibición de la peroxidación lipídica (decoloración del β -caroteno)), verificándose resultados positivos en el extracto hidroetanólico estudiado, sobresaliendo el ensayo de la actividad captadora de radicales DPPH con los valores de EC₅₀ más bajos (mejor potencial antioxidante). En la evaluación de la citotoxicidad se utilizaron varias líneas celulares tumorales (HepG2, NCI-H460, MCF-7 y HeLa) y un cultivo de células primarias no tumorales (PLP2), aplicando el ensayo de la sulforrodamina B. Los resultados demostraron la ausencia de capacidad antiproliferativa en todas las líneas probadas, sin embargo, también fue evidente la ausencia de toxicidad del extracto. La actividad antimicrobiana fue analizada a través del método de microdilución en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y en hongos, alcanzando resultados satisfactorios para la mayoría de las bacterias y hongos testados.

Teniendo en cuenta el procedimiento de optimización de la extracción para la obtención de un extracto rico en antocianinas, la extracción por maceración reveló la obtención de rendimientos satisfactorios ($114,74 \pm 0,58$ mg/g de extracto), cuando se aplicaron las variables $t = 65,37 \pm 3,62$ min, $T = 85,00 \pm 1,17$ °C y $S = 62,50 \pm 4,24$ %. El procedimiento y las condiciones optimizadas en este trabajo triplicaron el contenido total de antocianinas obtenidas, usando el método convencional, dando origen a la importancia de la optimización de un procedimiento de extracción. Además de los aspectos químicos, el extracto óptimo rico en antocianinas fue analizado teniendo en

cuenta parámetros físicos (color), y los resultados evidenciaron una mejora significativa del color púrpura, comparativamente con las hojas frescas y el polvo liofilizado de las hojas secas de la albahaca roja rubí. Este extracto también fue evaluado en cuanto a sus propiedades bioactivas, siendo que la actividad antioxidante del extracto optimizado reveló un potencial menor o muy semejante al extracto obtenido por el método convencional. Sin embargo, reveló resultados muy prometedores en cuanto al efecto citotóxico y antimicrobiano.

Así, *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* demostró ser una variedad rica en compuestos bioactivos, que pueden ser aplicados en la industria alimentaria y farmacéutica para sustituir las moléculas artificiales, añadiendo valor a las matrices de incorporación.

Abstract

The *plantae* kingdom includes a vast diversity of species and in recent years has been the subject of several studies, due to its composition in nutrients and molecules of high interest for the food and pharmaceutical industries. Visually, the differentiation of plants depends on their colour, particularly in the concentration of natural pigments present in the leaves, for example, chlorophylls, carotenoids, anthocyanins, betalains, and other colorant compounds. Due to growing consumer concern about the adjacent effects of artificial colorants, the food industry has invested in replacing these additives by natural pigments obtained from vegetable matrices.

The *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* variety, popularly known as red rubin basil, belongs to the genus *Ocimum* and the purple colour results from its high concentration in anthocyanin compounds. This variety has shown therapeutic action, namely, diuretic, anti-inflammatory and antispasmodic properties.

The main objective of this work was to deepen the knowledge about the leaves of this variety through the evaluation of its physical parameters (colour), nutritional (moisture content, ash, proteins, fat, carbohydrates and energy) and chemists (free sugars, organic acids, tocopherols and fatty acids) characterization; followed by the evaluation of phenolic compounds content and bioactive potential (antioxidant activity, antimicrobial activity and cytotoxicity) of the hydroethanolic extract. The extraction optimization of anthocyanin's was also studied through a heat assisted extraction technology (HAE), by applying a response surface methodology analysis. The obtained optimized extract rich in anthocyanin compounds was further evaluated regarding its colorant capacity and bioactive properties by applying the above mentioned assays.

The nutritional profile was evaluated using official methodologies of food analysis (AOAC), demonstrating high contents of the carbohydrate, contrary to the lipid fraction that appeared in smaller amounts.

Regarding the chemical composition, free sugars were identified/quantified using an HPLC-RI system, organic acids by UFLC-DAD, tocopherols by HPLC-fluorescence, and fatty acids by GC-FID. The samples revealed the presence of several of these interesting compounds, namely four free sugars and seven organic acids, presenting high levels of glucose and quinic acid, respectively. Concerning tocopherol contents, α -, β -, γ -, and δ -tocopherol isoforms were detected, with γ -tocopherol being the most

abundant. The fatty acid profile revealed the presence of twenty compounds, with α -linolenic acid (C18: 3n3) as the major molecule.

The determination of the phenolic profile was carried out through an HPLC-DAD-ESI/MS system, revealing 26 phenolic compounds, of which 13 compounds were identified as non-anthocyanin phenolic compounds, being rosmarinic acid the major compound and 13 anthocyanin compounds, being cyanidin-3-(6,6'-di-*p*-coumaroyl)-sophoroside-5-glucoside the most abundant molecule.

Concerning the bioactivity assays, the antioxidant potential was evaluated through three *in vitro* assays (DPPH radical scavenging activity, reducing power and inhibition of lipid peroxidation through the β -carotene bleaching inhibition), revealing good results for the hydroethanolic extract studied, in which the DPPH assay showed the lowest EC₅₀ values (best antioxidant potential). The antimicrobial activity was assayed using the microdilution method in Gram-positive and Gram-negative bacteria, and in fungi, and satisfactory results were obtained for most of bacteria and fungi tested. The cytotoxicity was evaluated using several tumour cell lines (HepG2, NCI-H460, MCF-7 and HeLa) and in a non-tumour primary cell culture (PLP2) by applying the sulforhodamine B assay. The results demonstrated the absence of anti-proliferative capacity in all the tested cell lines; however, it was also evident the absence of toxicity of the extract using the non-tumour primary cell culture – PLP2.

Taking into account the optimization of the extraction process, to obtain an rich extract in anthocyanins, the extraction by HAE revealed 114.74 ± 0.58 mg of anthocyanins per g of extract, when applying the variables $t = 65.37 \pm 3.62$ min, $T = 85.00 \pm 1.17$ °C and $S = 62.50 \pm 4.24$ %. By applying these conditions, it was possible to obtain an extract 3x richer in the total amount of anthocyanin's, in comparison with the conventional method, giving rise to the importance of optimizing an extraction procedure. In addition to the chemical aspects, the optimal extract rich in anthocyanin's was analysed taking into account physical parameters (colour), and the results showed a significant improvement in purple colour compared to the fresh leaves and lyophilized powder of red rubin basil. This extract was also evaluated regarding its bioactive properties, the antioxidant activity of the optimized extract revealed a lower or very similar antioxidant potential in comparison to the extract obtained by the conventional method. However, it showed very promising results regarding the cytotoxic and antimicrobial effect.

Thus, *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* has been shown to be a rich variety in bioactive compounds, which can be applied in the food and pharmaceutical industry to replace artificial molecules, adding value to the incorporated matrices.

1. Introdução

1.1. Caracterização de *Ocimum basilicum* var. *purpurascens*

O reino das plantas engloba uma vasta diversidade de espécies que têm adquirido elevada importância ao longo dos anos. Inicialmente, o recurso a estas matrizes era feito apenas para complemento da alimentação, contudo, a sua aplicabilidade tornou-se mais vasta, utilizando-se no tratamento de doenças, na confecção de roupa, ferramentas, armas de caça e como forma de combustível (Haraguchi & Carvalho, 2010).

Desta forma, as plantas revelaram ser uma influência direta no quotidiano do ser humano, pois para além de fornecerem alimentos e aromas, também têm um papel importante como matéria-prima para as indústrias (madeira, resina, óleo, borracha, fibras para o fabrico de cordas e tecidos) e devido ao seu conteúdo em moléculas bioativas são fundamentais para o desenvolvimento de medicamentos e inseticidas (Yopp et al., 2018).

A espécie *Ocimum basilicum* L. (**Figura 1A**), comumente conhecida por manjericão, é uma planta aromática anual pertencente à família *Lamiaceae*. Apesar de ser nativa das regiões tropicais da Ásia, África, América Central e do Sul, o cultivo desta espécie faz-se, atualmente, um pouco por todo o mundo (Teofilović et al., 2017). Caracteriza-se pela sua coloração verde, podendo atingir cerca de 90 cm de altura e apresentando folhas lanceoladas, brilhantes e perfumadas (Carocho et al., 2016).

O *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* (**Figura 1B**) (manjericão vermelho rubi), pertence à espécie *Ocimum basilicum* L. e é caracterizada pela sua cor púrpura, devido à alta concentração de antocianinas presentes nas suas folhas (Flanigan & Niemeyer, 2014). Caracteriza-se por conter flores cor de rosa, caule e folhas de cor púrpura (da Silva et al., 2017; El-Ziat et al., 2018).



Figura 1. Manjericão (A) e manjericão vermelho rubi (B).
("Jardim Botânico UTAD | *Ocimum basilicum* L.," n.d.).

1.1.1. *História, benefícios e precauções*

Desde a antiguidade que o manjeriço é popularmente usado, não só na culinária, mas também como agente terapêutico na medicina tradicional. Assim, tem vindo a ser utilizado no tratamento de várias doenças, tais como tosse, diarreia, dores de cabeça, disfunção renal, tratamento de acne, dores abdominais, inflamações, diabetes e doenças oculares, apresentando também ações estimulantes, anti-espasmódicas, carminativas, digestivas, antifúngicas, inseticidas e antibacterianas (Ahmad et al., 2016; Bhatti et al., 2017; Varga et al., 2017). Tradicionalmente, esta planta é utilizada como condimento na indústria alimentar, no entanto, vários estudos têm revelado que a sua ação vai mais além do conceito de especiaria. O manjeriço vermelho rubi é usado como planta ornamental, embora o seu óleo essencial seja utilizado na medicina popular. Contudo, na literatura não se encontram relatadas as propriedades medicinais de *O. basilicum* var. *purpurascens* (da Silva et al., 2017; El-Ziat et al., 2018).

Srivastava et al. (2016) determinou o potencial antioxidante de três cultivares de *O. basilicum*, entre as quais manjeriço vermelho rubi, utilizando extratos hidroetanólicos (60:40 v/v) obtidos a partir das folhas da planta. Estes autores constataram a presença de polifenóis com atividade antioxidante, nomeadamente o ácido rosmarínico, chicórico, cafeico, *p*- e *m*-cumárico e ferúlico, sendo que o ácido rosmarínico foi identificado como a molécula antioxidante predominante (10,02 mM/100 g ms). Da pesquisa efetuada, não existem mais estudos que reportam mais resultados sobre esta bioatividade utilizando um extrato alcoólico de *O. basilicum* var. *purpurascens*.

No entanto, um estudo levado a cabo por Takwa et al. (2018), comprovou que o extrato hidroetanólico (80:20; v/v) de *O. basilicum* L. é composto essencialmente pelo ácido rosmarínico e possui atividade antioxidante, sem toxicidade associada até à dose testada de 400 µg/mL. Este estudo revelou ainda que, quando incorporado o extrato em pão não altera as suas características nutricionais, mostrando ser uma possível alternativa aos conservantes artificiais. Também Carocho et al. (2016), realizou um estudo onde incorporou o extrato de folhas de manjeriço, obtido por decocção, em queijo, a fim de avaliar o poder conservante. Nessa avaliação ficou provado que o extrato proporcionou atividade antioxidante aos queijos, reduzindo a humidade e preservando os ácidos gordos insaturados e as proteínas.

Num estudo realizado por Vieira et al. (2014), onde avaliaram a composição química e atividade antifúngica do óleo essencial das folhas de *O. basilicum* var *purpurascens*, foram identificados vinte compostos orgânicos, onde o mais abundante foi o linalol (41.5 %). Na avaliação da atividade antimicrobiana, este óleo apresentou atividade antifúngica contra as estirpes *Candida parapsilosis* e *Candida albicans* (CMF 5000 µg/mL).

Os dados bibliográficos relativos à espécie *O. basilicum* não fazem referência aos cuidados a ter com a sua ingestão, porém, tal como acontece com outras plantas, é importante que esta seja feita de forma equilibrada para que os seus compostos não se tornem tóxicos (Carod Artal, 2014). O elevado interesse no consumo desta espécie tem desencadeado vários estudos, a fim de avaliar o grau de toxicidade dos seus óleos, de forma a prevenir o uso incorreto (da Silva, 2015).

Venancio (2006) estudou a toxicidade aguda do óleo essencial de *O. basilicum* L. em camundongos e concluiu que o óleo apresentou alta toxicidade quando administrado por via intraperitoneal. Por outro lado, os resultados obtidos por da Silva (2015) concluíram que o óleo essencial de manjeriço apresenta baixa citotoxicidade e genotoxicidade. Tendo em conta, outro trabalho realizado (Mangetti et al., 2017) verificou-se que o óleo essencial do manjeriço apresenta citotoxicidade frente à linha celular NCTC Clone 929 (células do tecido conjuntivo de rato).

Contudo, apesar destes resultados, torna-se relevante o desenvolvimento de mais trabalhos de investigação, com diferentes extratos e diferentes técnicas de extração, a fim de aprofundar o conhecimento em inúmeros parâmetros e desenvolver metodologias que minimizem ou evitem a citotoxicidade.

1.1.2. *Composição química*

Nos últimos anos, o trabalho feito pela comunidade científica sobre as propriedades das plantas, bem como dos seus compostos, permitiu compreender que os principais benefícios das espécies vegetais se devem aos compostos resultantes do seu metabolismo secundário, que podem ser classificados como compostos bioativos, isto porque, quando incluídos na dieta exercem funções benéficas para a saúde (Lima et al., 2017).

As variedades de *O. basilicum* L. são fontes de moléculas bioativas, tais como, compostos fenólicos (**Tabela 1**) que resultam do seu metabolismo secundário e têm associadas propriedades antioxidantes (McCance et al., 2016).

Tabela 1. Compostos fenólicos presentes em *O. basilicum* L. e em *O. basilicum* var. *purpurascens*.

Classe de compostos	<i>Ocimum basilicum</i> L.		<i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i>	
	Compostos bioativos	Referências	Compostos bioativos	Referências
Ácidos fenólicos	Ácido chicórico	[1]	Ácido cafeico	
	Ácido caftárico		Ácido caftárico	
			Ácido gentísico	[3]
			Ácido chicórico	
			Ácido rosmarínico	
	Ácido cafeico			
	Ácido iunanóico F e E			
	Isômero do ácido salvianólico A e K			
	Ácido litoespérmico A	[2]		
	Ácido sangerínico			
Ácido rosmarínico				
Ácido salvianólico B				
Flavonoides	Quercetina- <i>O</i> -pentosil-hexósido		Cianidina-3,5-diglucósido	
	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinósido		Peonidina-3,5-diglucósido	[3]
	Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido	[2]	Cianidina-3-glicósido	
	Canferol- <i>O</i> -pentosil- hexósido		Cianidina-3-(<i>p</i> -cumaroilglucósido)-5-glucósido	
	Acetil quercetina-3- <i>O</i> -hexósido		Cianidina- <i>p</i> -cumaroil	
	Canferol-3- <i>O</i> -rutinósido		Cianidia malonil	
			Cianidina (aglicona)	[4]
			Peonidina (aglicona)	
		Peonidina-3-(<i>p</i> -cumaroilglucósido)-5-glucósido		
		Cianidina-3-(<i>p</i> -cumaroilglucósido)		

[1] Lee & Scagel, 2009; [2] Carochio et al., 2016; [3] Flanigan & Niemeyer, 2014; [4] Phippen & Simon, 1998.

Estudos relatam que o composto maioritário presente na espécie *O. basilicum* é o ácido rosmarínico, que exhibe um potencial bioativo, atuando na inibição de lipoxigenases e cicloxigenases, com ação anti-inflamatória, antioxidante, adstringente, antimutagénica, antibacteriana e antidiabética (Złotek et al., 2015).

Para além deste ácido fenólico, as moléculas que se destacam em *O. basilicum* var. *purpurascens*, são os compostos antociânicos (flavonoides). Estas moléculas apresentam capacidade corante e importantes benefícios para a saúde do consumidor,

como por exemplo, efeitos anti-inflamatórios, antitumorais, neuroprotetores e propriedades antioxidantes (Flanigan & Niemeyer, 2014; Szymanowska et al., 2015).

1.2. Antocianinas e suas aplicações como pigmentos naturais

O reino vegetal é constituído por inúmeras espécies diferenciadas por diversos parâmetros, nomeadamente físicos (como por exemplo, a cor) e químicos (tais como, composição em compostos fenólicos não antociânicos e antociânicos). A formação da cor depende da concentração de pigmentos naturais existentes na planta. Estes podem ser divididos em quatro grandes grupos: clorofilas (verde), carotenoides (amarelo, laranja, vermelho), antocianinas (vermelho em meio ácido, azul em meio alcalino e roxo) e betalaínas (vermelho) (Rodriguez-Amaya, 2016; Khoo et al., 2017).

Os pigmentos naturais têm atraído muita atenção da comunidade científica, levando à realização de estudos que se baseiam na caracterização destes compostos e na sua posterior aplicação, não só na indústria alimentar como corantes naturais, mas também na indústria farmacêutica, usufruindo do seu potencial terapêutico (Rodriguez-Amaya, 2016).

Dentro dos corantes naturais solúveis em água, encontram-se as antocianinas (**Figura 2**) que, quimicamente, pertencem ao grupo dos flavonoides. Estes compostos, para além de serem responsáveis pela cor, exibem outras funções, nomeadamente, a atração de agentes polinizadores, potencial antioxidante (que contribui como protetor das plantas face a algumas doenças), e como protetores de ataques herbívoros e de stresses abióticos. A somar a estas propriedades, ainda intervêm contra as radiações ultravioleta e contra as contaminações virais e microbianas (Sigurdson et al., 2017; Ongkowijoyo et al., 2018).

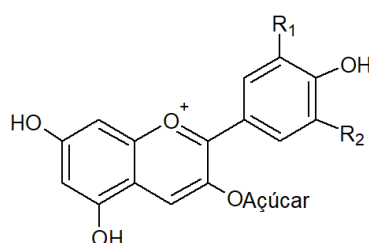


Figura 2. Estrutura química de antocianinas.
Desenhada com o programa ACD/ChemSketch.

Devido às suas propriedades terapêuticas e corantes, as antocianinas têm captado muita atenção por parte dos investigadores. Vários trabalhos demonstram que os compostos antociânicos possuem efeitos positivos relativamente ao cancro, diabetes, processos anti-inflamatórios e antimicrobianos, doenças cardiovasculares e na prevenção da obesidade (Braga et al., 2017; Gowd et al., 2017; Abdel-Aal et al., 2018; Xie et al., 2018). As antocianinas estão, também, associadas à ação antioxidante justificada pela sua deficiência em eletrões e consequente reatividade perante as espécies reativas de oxigénio (ROS). Diferentes estudos demonstraram que as antocianinas têm maior poder antioxidante comparativamente a vários compostos antioxidantes, como o catecol e o trolox (Martín et al., 2017a).

Embora já tenham sido realizados vários estudos sobre a aplicabilidade de corantes naturais em diversos sectores industriais, é na industria alimentar que têm sido mais incorporados (Martins et al., 2016). O sector alimentar tem vindo a trabalhar no desenvolvimento de técnicas que permitam, de forma eficaz, substituir os corantes artificiais por alternativas naturais, que para além da sua função de melhorar as características organolépticas dos produtos alimentares, são também benéficos para a saúde do consumidor (Cortez et al., 2017). Na União Europeia, as antocianinas são identificadas com o código E163 e a sua incorporação pode ser efetuada em diversos produtos, nomeadamente alguns queijos, cereais, doces, conservas e pastas de peixes (Jornal Oficial da União Europeia, 2011).

1.2.1. *Aspetos químicos e propriedades das antocianinas*

Os flavonoides são produtos do metabolismo secundário das plantas caracterizados por terem um esqueleto de 15 carbonos na forma C6-C3-C6 (**Figura 3**).

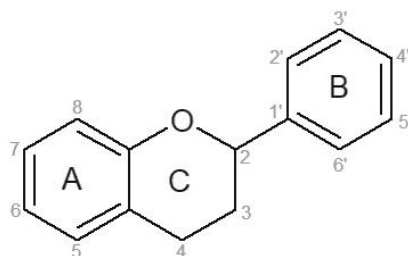


Figura 3. Estrutura molecular dos flavonoides.
Desenhada com o programa ACD/ ChemSketch.

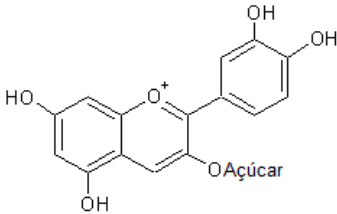
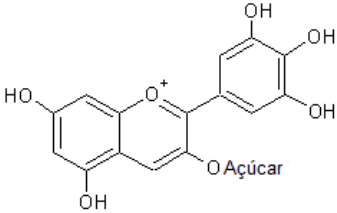
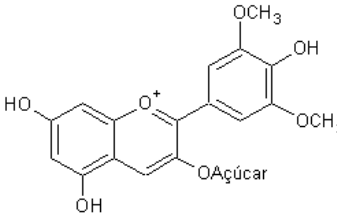
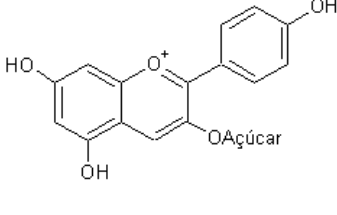
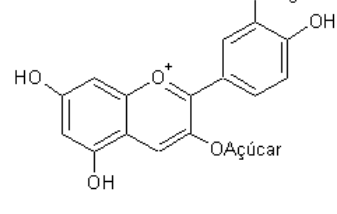
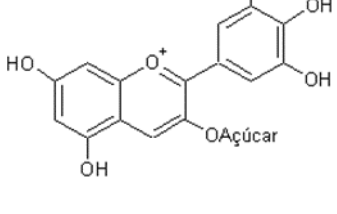
Na natureza são encontradas mais de 9000 estruturas de flavonoides, entre as quais 600 correspondem a compostos antociânicos estruturalmente distintos (Martín et al., 2017b). Quimicamente, as antocianinas são glucósidos de antocianidinas (aglicona) e têm como estrutura base o catião flavílico ou 2-fenilbenzopirilo, sendo que diferem entre si através de diversos aspetos, particularmente, do número de grupos hidroxilo e/ou metílico presentes na aglicona, da natureza, do número e posição dos açúcares e da existência ou não de um grupo acilo (ácidos alifáticos ou aromáticos ligados à molécula de açúcar, que geralmente é a glucose) (Cortez et al., 2017; Teng et al., 2017).

As antocianidinas mais comuns nas plantas, e que representam maior interesse são: cianidina (cor laranja-vermelho), delphinidina (cor azul-vermelho), malvidina (cor azul-vermelho), pelargonidina (cor laranja-vermelho), peonidina (cor laranja-vermelho) e petunidina (cor azul-vermelho) (**Tabela 2**), salientando-se a cianidina-3-glucósido, pois forma-se como resultado do pH baixo das plantas (Khoo et al., 2017; Martín et al., 2017b).

Estudos indicam que as antocianinas aciladas são mais estáveis, uma vez que a acilação diminui a polaridade das antocianinas e impede a sua mudança de tamanho molecular e da estrutura espacial, o que leva à diminuição da sua sensibilidade (Martín et al., 2017b; Teng et al., 2017). Por este motivo, os compostos antociânicos mais adequados para aplicar em produtos alimentares são as moléculas aciladas, todavia a estabilidade pode variar consoante o número de grupos acilo e os locais de acilação (Martín et al., 2017b).

São vários os fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam e influenciam a estabilidade das antocianinas aquando da sua incorporação, nomeadamente o pH do produto em que se inserem, a temperatura de manipulação e armazenamento, a composição química do produto (presença de enzimas, proteínas, iões metálicos e até de outros flavonoides) e a exposição à luz e ao oxigénio (Rodríguez-Amaya, 2016). Contudo, para que estes compostos sejam utilizados como corantes naturais na indústria alimentar é extremamente importante garantir a estabilidade da cor.

Tabela 2. Antocianinas mais comuns nas plantas.

Antocianinas	Estrutura química	R1	R2	Cor
Cianidina		OH	H	Laranja vermelho
Delfinidina		OH	OH	Azul vermelho
Malvidina		OCH ₃	OCH ₃	Azul vermelho
Pelargonidina		H	H	Laranja vermelho
Peonidina		OCH ₃	H	Laranja vermelho
Petunidina		OCH ₃	OH	Azul vermelho

(Fonte: Fernandes et al., 2014; Flores et al., 2016; Martín et al., 2017b).
Estruturas desenhadas com o programa ACD/ ChemSketch.

1.2.2. Métodos de extração e estabilização

As antocianinas podem ser encontradas em várias fontes naturais nomeadamente em frutos, cereais, folhas, flores e raízes (**Figura 4**). Quando se procede à sua extração, tal como com outros compostos naturais, é necessário realizar um pré-tratamento da amostra de modo a evitar a oxidação e, conseqüentemente, degradação dos compostos; para tal, recorrer-se à secagem, liofilização ou congelação da amostra (Martín et al., 2017a, 2017b).



Figura 4. Matrizes naturais ricas em antocianinas.
(Adaptada de Martín et al., 2017a; Flores et al., 2016).

No que diz respeito aos métodos de extração, estes podem ser variados dependendo da matriz natural e do objetivo final do trabalho. Porém, uma das técnicas mais utilizadas, é a extração por maceração, que para além de ser a técnica mais simples e económica, promove de forma eficaz a extração de compostos ativos recorrendo a solventes orgânicos, ou a misturas água/álcoois, e pode ser executada com ou sem temperatura e agitação (Albuquerque et al., 2017).

Devido à grande aplicabilidade dos compostos antociânicos existe um maior interesse em utilizar métodos de extração mais eficientes, com tempos mais curtos, de forma a aumentar o rendimento destas moléculas. Como exemplo existem as extrações de fase sólida, fluido supercrítico, fluido pressurizado, assistida por micro-ondas, assistida por ultrassom, assistida por enzimas, entre outras (Martín et al., 2017b; Ongkowijoyo et al., 2018). Na **Tabela 3** estão mencionados vários estudos de extração de antocianinas, onde se recorre a distintas técnicas com diferentes solventes, temperaturas, potência/frequência e pressão dependendo da técnica aplicada.

Tabela 3. Técnicas de extração de antocianinas.

Técnica de extração	Planta	Parte usada	Condições de extração			Referência
			Solvente	Temperatura (°C)/ Tempo	Potência/Frequência (W/ kHz)	
Maceração	<i>Rubus fruticosus</i> L.	Fruto	Metanol acidificado (HCl 0,01%)	Temperatura ambiente 24h		[1]
	<i>O. basilicum</i> var. <i>purpurascens</i>	Folhas	Metanol acidificado (HCl 0,1%)	4°C 4h		[2]
Soxhlet	<i>Rubus fruticosus</i> L.	Fruto	Etanol Metanol	80°C 5h		[1]
Fluido supercrítico com CO ₂	<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	Fruto	90% CO ₂ 5% de água 5% de etanol	40°C		20MPa [3]
Líquido pressurizado	<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	Fruto	Água acidificada (pH=2,0)	40°C 5-30'		20MPa [3]
	<i>Euterpe edulis</i> Mart.	Fruto	Água acidificada	40°C		10MPa [4]
	<i>Rubus fruticosus</i> L.	Fruto	Etanol:água (50:50)	100°C 35'		7,5MPa [1]
Extração assistida por ultrassom	<i>Vitis vinifera</i> cv. O Plavac mali	Fruto	Eutéticos profundos (cloreto de colina:ácido oxálico (1:1))	65°C 50'	35kHz	[5]
	<i>Morus nigra</i> L.	Fruto	Metanol a 76% (pH=3)	48°C 10'		[6]
	<i>Fragaria</i> spp	Fruto	Metanol acidificado (0,20% de HCl)	20°C 10'		[7]
	<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	Fruto	Etanol a 70% Acidificado (HCl-pH 2,0 ± 0,1)	40°C 50'	40 kHz	[8]
Extração assistida por micro-ondas	<i>Prunus cerasus</i> var. Marasca	Fruto	Metanol 80% acidificado (HCl 0,1%)	60°C 6-9'	400W	[9]
Extração assistida por enzimas	<i>Prunus nepalensis</i> L.	Fruto	Celulase (10% E/S)	4°C 180'		[10]

[1] Machado et al., 2015; [2] Phippen & Simon, 1998; [3] Paes et al., 2014; [4] Garcia-Mendoza et al., 2017; [5] Bubalo et al., 2016; [6] Espada-Bellido et al., 2017; [7] Canuto et al., 2016; [8] Rocha et al., 2018; [9] Garofulić et al., 2013; [10] Swer et al., 2016.

Num estudo levado a cabo por Machado et al. (2015), são comparadas técnicas de extração de antocianinas de *Rubus fruticosus* L., onde o maior rendimento de extração, expresso em miligramas de equivalentes de cianidina-3-*O*-glucósido (C3G)/grama de resíduo fresco (RF), foi obtido utilizando uma metodologia de extração por Soxhlet com etanol ($1,68 \pm 0,23$ mg C3G/g RF) e a técnica de líquido pressurizado com etanol a 50%, foi a que apresentou menor rendimento ($1,02 \pm 0,11$ mg C3G/g RF). Porém, quando se faz a comparação com os tempos de extração conclui-se que é mais rentável realizar uma extração por líquido pressurizado que demora 35 minutos do que uma extração por Soxhlet que leva 5 horas.

Paes et al. (2014) fizeram extração de antocianinas de *Vaccinium myrtillus* L., e obtiveram os melhores rendimentos, expressos em mg de antocianinas/100 g de extrato, utilizando uma extração por Soxhlet com etanol (457 ± 2 mg/100 g), líquido pressurizado com água 100% acidificada (263 ± 07 mg/100 g) e fluido supercrítico com 90% CO₂ + 5% H₂O + 5% de etanol (1071 ± 64 mg/100 g).

Independentemente do procedimento de extração escolhido é fundamental a sua otimização, uma vez que normalmente, os parâmetros de otimização incidem sobre o solvente e a relação tempo/temperatura da extração (Martín et al., 2017b). Assim, a escolha do solvente tem de ter por base a estrutura química das antocianinas, que são constituídas por agliconas apolares, onde as substituições nos anéis aromáticos são maioritariamente polares, por isso o solvente deve ser, preferencialmente, uma mistura de álcool/água (Martín et al., 2017b). O álcool mais usado é o etanol (pois não é considerado tóxico nem na indústria alimentar nem na prática clínica), embora se possa também utilizar metanol, acetona e acetonitrilo. O solvente de extração deve ser suficientemente acidificado, o quanto basta, para que as antocianinas não sofram hidrólise parcial das frações acilo e mantenham a sua forma de catião flavílico (cor vermelha), que é a forma mais estável das antocianinas (Flores et al., 2016; Teng et al., 2017). De forma a ajustar o pH das antocianinas recorre-se aos ácidos clorídrico, cítrico, málico, ascórbico, tartárico e acético (Ongkowijoyo et al., 2018).

Tendo em conta a relação tempo/temperatura de extração, obtém-se maior quantidade de antocianinas quando se realizam extrações a curto tempo, dependendo do tipo de metodologia aplicada. Contudo, se as extrações utilizarem tempos longos, para se conseguir maior rendimento de extração o ideal é executá-la à temperatura ambiente, a fim de evitar a degradação dos compostos antociânicos (Flores et al., 2016). No entanto,

este princípio não é linear, uma vez que, a aplicação de temperaturas moderadas a tempos curtos, pode aumentar o rendimento de extração destes compostos (**Tabela 3**).

De forma a fazer uma avaliação da influência destas três variáveis (tempo, temperatura e solvente) sobre o rendimento de extração de antocianinas de matrizes naturais, tem-se recorrido à metodologia de superfície de resposta (MSR). Esta é uma ferramenta estatística utilizada na otimização de processos de extração, essencial a nível industrial uma vez que garante as condições de forma a maximizar o rendimento de extração com o menor gasto de tempo e reagentes, uma vez que se baseia na avaliação de um fator de cada vez, de forma a prever as condições ótimas e as interações entre variáveis (Alexandre et al., 2017b, 2017a).

Com o intuito de caracterizar as amostras de antocianinas, após extração, são utilizadas várias técnicas de separação, deteção e quantificação dos compostos presentes (Martín et al., 2017b). O método de separação mais utilizado nas amostras de antocianinas é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), onde a fase móvel é altamente ácida (pH=2) de modo a evitar a interconversão das moléculas dependentes do pH, mantendo-se a forma de catião flavílico.

A deteção com um detetor de díodos (DAD) e por espectrometria de massa (MS), são duas técnicas frequentemente utilizadas como métodos cromatográficos de deteção de compostos antociânicos, sendo o MS (espectrómetro de massa) o detetor mais usado. A MS é uma técnica que fornece dados qualitativos e quantitativos estruturais das antocianinas, como por exemplo: a estrutura global das aglíconas, o tipo e número de açúcares que tem associados e a existência de outras substituições, bem como a sua identificação. A banda de absorção máxima de antocianinas em DAD está na faixa dos 520-560 nm (Martín et al., 2017b; Ongkowijoyo et al., 2018).

Segundo a literatura, as antocianinas são compostos com baixa estabilidade e, conseqüente, perda de cor o que dificulta a sua aplicabilidade nas indústrias alimentar e farmacêutica. De modo a contornar esta desvantagem, a comunidade científica tem procurado métodos químicos e físicos de estabilização, tendo como finalidade aumentar o tempo de prateleira de produtos processados corados com antocianinas e também aumentar a sua biodisponibilidade no organismo (Flores et al., 2016; Martins et al., 2016). A estabilidade pode recair sobre a copigmentação, que se baseia na adição de compostos, nomeadamente aminoácidos, nucleótidos, alcaloides, ácidos orgânicos, outros flavonoides, polímeros, metais, ou polissacáridos, ao extrato com a finalidade de reduzir

a degradação dos pigmentos. A adição de polímeros leva à formação de complexos, polímero/antocianina. Sendo as proteínas um exemplo de polímeros, estas ligam-se às antocianinas através de ligações de hidrogénio, forças hidrofóbicas ou hidrofílicas e forças de van der Waals, obtendo-se complexos estáveis. No entanto, o grau de estabilidade vai depender da estrutura proteica, da temperatura e do pH (Arroyo-Maya et al., 2016; Cortez et al., 2017).

A estabilidade também pode ser controlada por microencapsulação, que consiste na construção de um revestimento em volta dos agentes bioativos, que funcionará como uma barreira protetora, impedindo a concretização das reações químicas e físicas durante o armazenamento do produto processado, mantendo assim, as suas propriedades biológicas e funcionais (Bakry et al., 2016). Esta técnica também promove a libertação controlada dos compostos bioativos, favorece o seu transporte e manipula e/ou mascara o sabor indesejável (Martín et al., 2017a).

Nos últimos anos, os corantes naturais têm recebido uma considerável atenção pois, diversos estudos têm constatado que não são prejudiciais para a saúde, comparativamente aos corantes artificiais.

1.3. Utilização de corantes naturais na indústria alimentar

A alimentação representa uma necessidade básica para a sobrevivência do ser humano, contudo a prática alimentar tem vindo a mudar positivamente ao longo do tempo. Dessa forma, a indústria alimentar tem investido em técnicas de conservação e melhoria dos alimentos, com o objetivo principal de preservar a qualidade dos produtos alimentares durante o seu processamento, transporte e armazenamento. Este fim é atingido com recurso à refrigeração, embalagens apropriadas e, também, aditivos, de modo a evitar a deterioração, minimizando as alterações dos produtos processados (Carocho et al., 2015b).

Segundo o Codex Alimentarius (1995) define-se como aditivo alimentar “qualquer substância que, normalmente, não é consumida como alimento por si só nem usada como ingrediente, tendo ou não valor nutritivo, sendo intencionalmente adicionada aos alimentos com um propósito tecnológico (e organolético) no seu fabrico, processamento, acondicionamento, transporte ou armazenamento, de modo a originar

possíveis alterações que, podendo ser diretas ou indiretas, afetam as características do alimento”.

O termo não inclui contaminantes ou substâncias adicionadas de forma a manter ou melhorar as qualidades nutricionais dos alimentos. Esta definição foi proposta em 1995 conjuntamente pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS), e revista nos anos subsequentes, sendo a última revisão de 2018 (Codex Alimentarius, 1995). Assim, de forma sucinta, os aditivos alimentares são todas as substâncias que, têm como objetivo manter, conceder ou intensificar as características físicas e organolépticas do produto alimentar onde são incorporados, impedindo alterações do produto final, como perda de cor e sabor, crescimento de microrganismos, entre outras (Karunaratne & Pamunuwa, 2017).

A aplicabilidade dos aditivos apenas é possível quando não apresentam risco para a saúde do consumidor nem o induzem em erro, levando-o a escolher produtos que não correspondem aos seus rótulos. Deste modo, estes têm de apresentar pelo menos uma vantagem, baseando-se na conservação da qualidade nutricional dos alimentos, no fornecimento de ingredientes ou componentes essenciais destinados a grupos de consumidores com necessidades dietéticas especiais, na melhoria da conservação ou da estabilidade de um alimento de forma a mudar positivamente as suas características organolépticas e no fornecimento de ajuda no processo tecnológico, desde que não seja aplicado para encobrir o uso de matéria-prima defeituosa ou de más práticas de manipulação (Codex Alimentarius, 1995).

Os aditivos alimentares abrangem uma panóplia de classes, nomeadamente conservantes, acidificantes, texturizantes, espessantes, humidificantes, anti-humidificantes, corantes e aromatizantes (Carocho et al., 2014).

Os agentes conservantes dividem-se em antimicrobianos, antioxidantes e agentes anti-escurecimento; por outro lado, os agentes corantes (artificiais) podem ser compostos azo, derivados quinoftalona, compostos triarilmetano e xantenos. Já a classe dos agentes aromatizantes contém edulcorantes, aromas naturais e artificiais e intensificadores de sabor. Por fim, os agentes texturizantes incluem emulsionantes e estabilizadores (Carocho et al., 2014).

É importante que a identificação dos aditivos alimentares seja universal, de modo a que os consumidores entendam o rótulo de qualquer produto alimentar no que diz respeito à sua composição em aditivos. Deste modo, foi criada uma nomenclatura

simplificada iniciando-se com a letra E e seguido de um código numérico, qualquer aditivo alimentar (Carocho et al., 2014).

Na Europa existe uma base de dados com os aditivos legais em todo o seu território, sendo que no Regulamento 1129 de 2011 estão listados todos os aditivos aprovados na UE, bem como a dose diária admissível (DDA) de cada produto. A DDA pode ser apresentada em miligramas de aditivo por quilograma de massa corporal (mg/kg) ou *quantum satis*, que significa que não existe um nível máximo numérico específico e que, por isso, as substâncias devem ser utilizadas de acordo com as boas práticas de fabrico, não ultrapassando a quantidade necessária para alcançar o objetivo pretendido (Carocho et al., 2014).

A identificação dos aditivos é complementada com uma série de 3 a 4 algarismos, sendo que o primeiro diz respeito ao tipo de aditivo em questão, E1 corantes, E2 conservantes, E3 antioxidantes e reguladores de pH, E4 espessantes, estabilizantes e emulsionantes, E5 corretores de acidez e substâncias minerais, E6 potenciadores de sabor, E7 antibióticos, E9 agentes de vitrificação e edulcorantes e de E10 a E15 são produtos químicos adicionais (Karunaratne & Pamunuwa, 2017). A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) e a *Food and Drug Administration* (FDA, Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos) são os principais reguladores de aditivos alimentares (Carocho et al., 2014).

Cada vez mais, os consumidores exigem produtos nutritivos e saudáveis e ao mesmo tempo deliciosos e atrativos. Deste modo, sendo a cor um atributo organoléptico, corresponde ao primeiro fator de aceitação e seleção de alimentos (Martins et al., 2016). A FDA (2010) define um corante como “qualquer corante, pigmento ou substância que, quando adicionado ou aplicado a um alimento, medicamento ou cosmético, ou ao corpo humano, é capaz (isoladamente ou através de reações com outras substâncias) de transmitir cor”.

Assim, os corantes alimentares são utilizados para compensar a descoloração que ocorre como resultado da exposição do produto ao ar, ao sol, à humidade, a temperaturas extremas e às condições de armazenamento. Aplicam-se, também, como forma de compensar as variações naturais ou sazonais que ocorrem nas matérias-primas alimentares por consequência do processamento e acondicionamento, e para intensificar a cor que naturalmente ocorre nos alimentos (Segurança Alimentar - Aditivos Alimentares, n.d.).

Existem três grupos de corantes alimentares, os naturais (que são obtidos naturalmente), os idênticos à natureza (que são sintetizados na indústria mas são iguais aos extraídos da natureza) e os artificiais (que são de síntese química feita pela indústria e não existem na natureza) (Carocho et al., 2015b). Ao longo do tempo a utilização de corantes alimentares tem aumentado, porém existem controvérsias e discórdias quanto aos seus efeitos sobre a saúde, o que leva à preferência pelos naturais (com DDA *quantum satis*), por parte não só do consumidor, mas também da indústria alimentar (Carocho et al., 2014).

Os corantes naturais são cada vez mais utilizados nos alimentos processados e de acordo com o regulamento (EU) N.º 1129/3011 da Comissão, de 11 de Novembro de 2011, dentro dos corantes naturais autorizados para aplicação alimentar, encontra-se o corante curcumina (E100), riboflavina (E101), cochonilha, ácido carmínico, carminas (E120), clorofilas e clorofilinas (E140), complexos cúpricos de clorofilas e clorofilinas (E141), caramelo simples (E150a), caramelo sulfítico cáustico (E150b), caramelo de amónia (E150c), caramelo sulfítico de amónia (E150d), carvão vegetal (E153), carotenos (E160a), anato, bixina, norbixina (E160b), extrato de pimentão, capsantina, capsorubina (E160c), licopeno (E160d), beta-apo-8'-carotenal (C 30) (E160e), luteína (E161b), vermelho de beterraba, betanina (E162), antocianinas (E163), carbonato de cálcio (E170), dióxido de titânio (E171), óxidos e hidróxidos de ferro (E172), alumínio (E173), prata (E174) e ouro (E175) (Jornal Oficial da União Europeia, 2011). Na **Tabela 4** estão representados exemplos de corantes alimentares naturais, bem como algumas das suas aplicações na indústria alimentar e a sua DDA.

A utilização de corantes pela indústria alimentar não é recente, muito pelo contrário, há milhares de anos que se recorre a corantes para melhorar o aspeto dos produtos alimentares, sendo que os primeiros corantes tiveram origem animal, mineral e vegetal (Harasym & Bogacz-Radomska, 2016).

Tabela 4. Exemplos de corantes naturais e respetivas aplicações na indústria alimentar.

Designação, cor e fonte do corante natural	Aplicação na indústria alimentar	Teor máximo (mg/kg)
Curcumina (E100) Amarela alaranjada	Queijos fundidos aromatizados.	100
	Emulsões de gorduras e óleos, pastas de barrar, doces, geleias, grânulos e flocos secos de batata.	<i>quantum satis</i>
	Enchidos, patês e terrinas de carne.	20
Raiz da <i>Curcuma L.</i>	Pastas de peixe e de crustáceos e peixe fumado.	<i>quantum satis</i>
Riboflavina (E101) Amarela alaranjada	Crustáceos pré-cozidos.	250
	Vinho e bebidas aromatizadas à base de vinho.	100
Saccharomyces cerevisiae	Conservas de frutos vermelhos.	<i>quantum satis</i>
	Produtos hortícolas em vinagre, óleo ou salmoura.	<i>quantum satis</i>
Clorofilas e clorofilinas (E140) Verde	Pastas de peixe e de crustáceos, peixe fumado e crustáceos pré-cozidos.	<i>quantum satis</i>
	Bebidas aromatizadas à base de vinho.	100
Urtica L.	Queijos curados, Sage derby.	<i>quantum satis</i>
	Conservas de frutos vermelhos, doces, geleias, marmeladas.	<i>quantum satis</i>
Carotenos (E160a) Amarelo alaranjado	Produtos hortícolas em vinagre, óleo ou salmoura.	<i>quantum satis</i>
	Pastas de peixe e de crustáceos e crustáceos pré-cozidos.	<i>quantum satis</i>
Daucus carota subsp. sativus	Queijos e produtos à base de queijos curados de cor laranja, amarela e branco-creme e queijo fundidos.	<i>quantum satis</i>
	Emulsões de gorduras e óleos, pastas de barrar, doces, geleias, marmeladas.	<i>quantum satis</i>
	Conservas de frutos vermelhos.	<i>quantum satis</i>
	Cereais para pequeno-almoço aromatizados com fruta.	<i>quantum satis</i>
Antocianinas (E163) Vermelhas, azul ou roxo Bagaço de <i>Vitis vinifera L.</i>	Produtos hortícolas em vinagre, óleo ou salmoura.	<i>quantum satis</i>
	Enchidos, patês e terrinas de carne.	<i>quantum satis</i>
	Pastas de peixe e de crustáceos, peixe fumado e crustáceos pré-cozidos.	<i>quantum satis</i>
	Queijo e produtos base de queijos curado de pasta vermelha marmoreada (ou jaspeada).	<i>quantum satis</i>
Antocianinas (E163) Vermelhas, azul ou roxo	Conservas de frutos vermelhos, doces, geleias e marmeladas.	<i>quantum satis</i>
	Cereais para pequeno-almoço aromatizados com fruta.	200
Bagaço de <i>Vitis vinifera L.</i>	Produtos hortícolas em vinagre, óleo ou salmoura.	<i>quantum satis</i>
	Pastas de peixe e de crustáceos, peixe fumada e crustáceos pré-cozidos.	<i>quantum satis</i>

Fonte: Jornal Oficial da União Europeia, 2011

1.3.1. *Corantes naturais vs corantes artificiais*

Sendo a prevenção da doença o “tratamento” eleito pelos consumidores, a sua atenção tem estado particularmente direcionada para os rótulos dos produtos alimentares,

farmacêuticos e cosméticos, recaindo a sua preferência sobre produtos que contenham ingredientes naturais seguros (Carocho et al., 2014; Ghazali et al., 2017).

No que diz respeito à indústria alimentar existe um grande avanço na substituição de corantes artificiais por naturais, devido aos efeitos prejudiciais de alguns corantes artificiais nomeadamente, urticárias, asma e reações imunológicas. Contudo, os corantes artificiais continuam a ser muito utilizados, pois são poucas as evidências científicas que demonstram inequivocamente os seus efeitos secundários, principalmente a médio e longo prazo (Carocho et al., 2014; Rodriguez-Amaya, 2016).

A substituição de aditivos artificiais por naturais pode levar a que a utilização dos primeiros fique proibida, porém não é uma decisão unânime sendo que podem ser proibidos em alguns países e autorizados em outros (Martins et al., 2016).

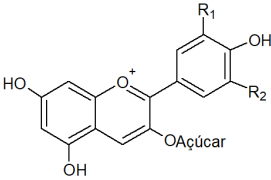
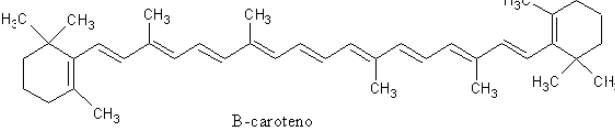
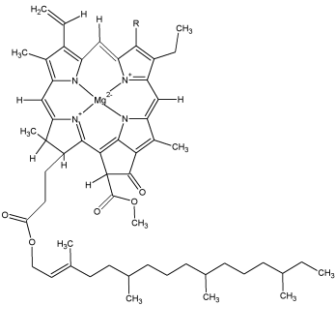
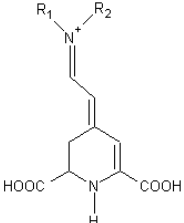
Segundo Sigurdson et al. (2017), a coloração dos alimentos terá surgido por volta de 1500 a.C., sendo os primeiros corantes naturais derivados de açafrão, paprica, curcuma e de várias flores (**Figura 5**). Atualmente, existe uma grande variedade de corantes naturais, porém nem sempre a sua aplicação é rentável devido aos procedimentos necessários, desde a recolha da matriz até ao isolamento da molécula corante que se pretende.



Figura 5. Corantes alimentares.
Fonte: Google Imagens

A classificação dos corantes naturais pode depender de vários fatores, sendo um deles a sua fonte natural. Estes podem ser de origem vegetal (como carotenoides e antocianinas), animal (como purinas e antraquinonas), microbiana (como carotenoides e pigmentos de *Monascus*) e mineral (como óxido de cromo). A classificação química é outra variável de categorização dos pigmentos naturais, sendo que estes compostos podem derivar de flavonoides, isoprenóides, pirróis e N-heterocíclicos (**Tabela 5**) (Shahid et al., 2013; Sigurdson et al., 2017).

Tabela 5. Classificação química dos corantes naturais.

Grupo Químico	Compostos	Estrutura	Cor	Fontes
Flavonoides	Antocianinas		Azul, vermelho e roxo	Frutos, vegetais, cereais e flores
Isoprenóides	Carotenoides	 B-caroteno	Amarelo, laranja e vermelho	Plantas superiores, bactérias, fungos, leveduras e insetos
Pirróis	Clorofilas		Verde	Frutos e vegetais verdes
N-heterociclos	Betalaínas		Laranja-amarelo, vermelho-violeta	Plantas e fungos

Fonte: Kang et al., 2018; Martín et al., 2017b; Polturak & Aharoni, 2017; Sigurdson et al., 2017. Estruturas desenhadas com o programa ACD/ChemSketch.

Os corantes naturais também se podem classificar segundo a cor que apresentam. Os pigmentos vermelhos, tais como as antocianinas em pH ácido e as betalaínas em pH ácido e neutro, são dos mais utilizados na indústria alimentar, uma vez que, para além de aparecerem naturalmente em muitas frutas e vegetais, são também considerados estimuladores do apetite (Gerardi et al., 2015; Sigurdson et al., 2017). Atualmente, estes corantes incorporam-se em alimentos como bebidas, produtos lácteos, carnes e cereais. Por outro lado, os carotenoides (como α e β -caroteno e licopeno) e a curcumina são responsáveis pela coloração laranja-amarelo e podem ser aplicados em margarinas,

produtos cozidos, doces, molhos, temperos, sopas, produtos lácteos e cereais. A cor roxa é obtida através da mistura de pigmentos vermelhos e azuis, como antocianinas e espirulinas. O azul pode ser obtido com a utilização de antocianinas em pH mais elevado quando comparado com a cor vermelha. A clorofila é um dos pigmentos verdes mais abundantes na natureza, porém a sua aplicação no ramo alimentar é limitada, pois é um composto altamente instável perdendo com facilidade a cor. O castanho, o preto e o branco são outras cores que os compostos corantes naturais também podem apresentar (Newsome et al., 2014; Rodriguez-Amaya, 2016; Sigurdson et al., 2017).

Atualmente, há uma grande variedade de compostos corantes de origem natural e artificial. No entanto, embora os pigmentos naturais tenham sido os primeiros a serem aplicados com a função de corante, a sua aplicação teve uma queda significativa, isto porque para além do tempo de obtenção de um corante natural ser elevado, tinha também associada a necessidade de uma grande quantidade de matéria prima. Isto levou a indústria a investir no desenvolvimento de corantes artificiais, recorrendo à síntese química e deixando os pigmentos naturais de lado (Shahid et al., 2013).

O primeiro corante artificial orgânico, de cor púrpura, foi sintetizado em 1856 pelo químico William Henry Perkin que o designou como malveína e, mais tarde, ficou conhecido como malva (**Figura 6**). Após essa data vários corantes orgânicos foram sintetizados pois apresentavam baixo custo de produção, alta e fácil estabilidade química, bem como alto poder de coloração dos produtos (Pérez-Ibarbia et al., 2016).

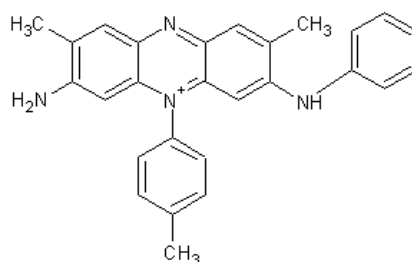


Figura 6. Estrutura química da malveína.
Desenhada com o programa ACD/ ChemSketch.

Os corantes artificiais incluem os corantes azo que são caracterizados pela presença do grupo funcional $N = N$. Quando os compostos deste grupo são reduzidos a aminas aromáticas podem tornar-se prejudiciais, pois algumas dessas aminas aromáticas são tóxicas, mutagênicas e cancerígenas (Carocho et al., 2014).

A tartarazina com coloração amarela (**Figura 7**) é um corante alimentar do grupo azo, aprovado pela UE e identificado com o código E102. É derivado do alcatrão hulha e solúvel em água, estando presente em alimentos, bebidas, medicamentos e cosméticos, com uma DDA de 7,5 mg/kg/dia (Li et al., 2014; Lipskikh et al., 2017). Este corante é um dos mais controversos, pois há estudos que o consideram seguro quando consumido segundo a DDA estabelecida, no entanto, existem outros estudos que evidenciam, não só a sua toxicidade em linfócitos humanos, mas também a sua contribuição para a cirrose biliar primária, promoção da peroxidação lipídica e efeitos negativos sobre o comportamento intelectual das crianças (Carocho et al., 2014; Li et al., 2014).

O amaranto (**Figura 7**) é outro corante azo com coloração vermelha, que está aprovado na UE mas proibido nos EUA e identifica-se pelo código E123. Este corante é derivado do petróleo e é aplicado em alimentos, bebidas, medicamentos e na indústria cosmética, com uma DDA de 0,15 mg/kg/dia. É também aplicado na coloração de têxteis, como lã e seda, e em fotografias (Sarıkaya et al., 2012; Carocho et al., 2014; Lipskikh et al., 2017). A proibição do seu consumo nos EUA está relacionada com o facto de existirem estudos que comprovam o seu potencial carcinogénico e embriotóxico, assim como se demonstrou a sua interferência negativa no desenvolvimento mental das crianças, podendo causar hiperatividade (Sarıkaya et al., 2012; Wang et al., 2018).

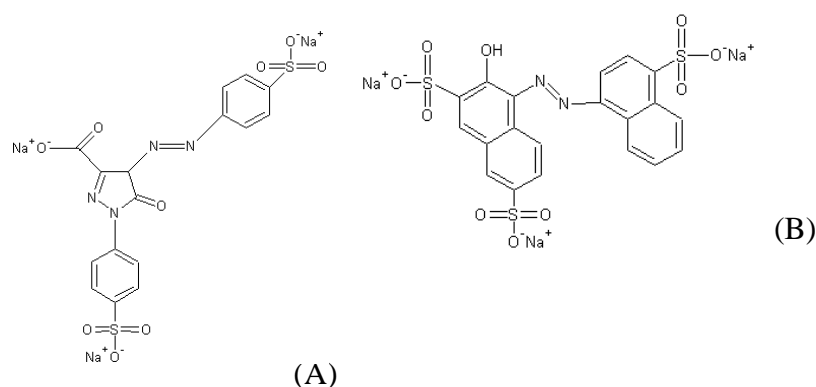


Figura 7. Estrutura química da tartarazina (A) e do amaranto (B).
Desenhadas com o programa ACD/ChemSketch.

O corante artificial amarelo de quinoleína (E104) (**Figura 8**) é derivado de quinofalona e apresenta uma cor amarelo-verde. Este aplica-se em alimentos,

medicamentos e cosméticos, com DDA de 10 mg/kg/dia, estando a sua utilização autorizada na UE. Porém, vários estudos suscitam dúvidas sobre a sua segurança, pois evidenciam doenças relacionadas com o seu consumo, tais como asma, erupções cutâneas e, tal como outros corantes artificiais, apresenta efeitos prejudiciais no comportamento das crianças, causando hiperatividade, irritabilidade, impulsividade, falta de atenção e de autocontrolo, podendo também ser a razão de algumas doenças neurológicas (Leleu et al., 2013; Carocho et al., 2014; Gao et al., 2014).

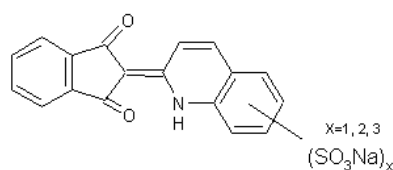


Figura 8. Estrutura química do amarelo quinoleína.
Desenhada com o programa ACD/ ChemSketch.

Os compostos triarilmetano são um grupo de corantes artificiais que possuem uma estrutura de trifenilmetano com vários substituintes nos anéis de arilo, como grupos de halogénio, alquilo, ácido sulfónico e ácido carboxílico. São utilizados nas tintas das canetas esferográficas, nos marcadores com ponta de feltro e nas canetas com ponta de fibra (Germinario et al., 2017). O azul brilhante FCF (E133) (**Figura 9**) faz parte destes compostos, estando a sua aplicação autorizada na UE e pode ser aplicado em alimentos e cosméticos, com uma DDA de 10 mg/kg/dia. Todavia a utilização deste corante engloba, também, têxteis, couros, plásticos, papéis, tintas de impressão e produtos domésticos (Lucová et al., 2013). A sua segurança é questionável, pois alguns estudos indicam que tem influência na respiração mitocondrial e provoca mutações somáticas indicadas pelo teste de mancha da asa de *Drosophila melanogaster*. Alguns autores desaconselham o consumo de doces que contenham este tipo de corantes, devido à sua absorção através da mucosa lingual (Carocho et al., 2014).

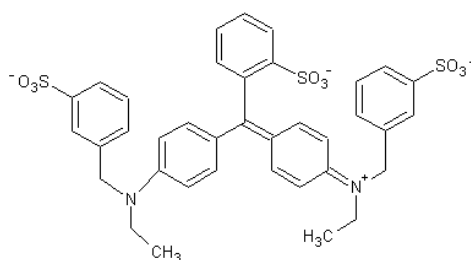


Figura 9. Estrutura química de azul brilhante.
Desenhada com o programa ACD/ ChemSketch.

A eritrosina (E127) (**Figura 10**) é um corante artificial xanteno, solúvel em água, de coloração vermelha, e a sua utilização está aprovada na UE, podendo ser incorporada em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos, com DDA de 0,1 mg/kg/dia. Para além disso, pode ser também incluída em tintas de impressão. Alguns estudos revelaram toxicidade associada a este composto, causando várias alergias, problemas de tiroide, anemia, neurotoxicidade e efeitos carcinogénicos (Carocho et al., 2014; Nayak & Shetti, 2016).

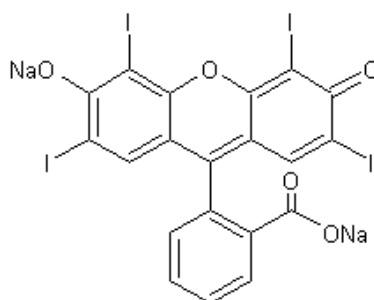


Figura 10. Estrutura química de eritrosina.
Desenhada com o programa ACD/ ChemSketch.

Por fim, os corantes artificiais índigo, caracterizados por conterem coloração azul são aplicados maioritariamente na indústria têxtil. Relativamente à indústria alimentar, é um corante proibido na UE, no entanto nos EUA é autorizada a aplicação de índigo carmim, pois a probabilidade de ocorrência de reações adversas é baixa quando administrado em quantidades estabelecidas pela entidade reguladora (Carocho et al., 2014; Martin et al., 2016; Pereira et al., 2017).

Independentemente de muitos dos corantes artificiais apresentarem efeitos negativos para o consumidor, a indústria alimentar continua a recorrer à sua utilização, porém de uma forma preventiva, não ultrapassando o teor máximo recomendado na incorporação em alimentos (Sigurdson et al., 2017). Na **Tabela 6**, apresentam-se alguns corantes artificiais bem como a sua utilização aprovada na UE e o teor máximo para cada grupo de alimentos.

Tabela 6. Exemplos de corantes artificiais e respetivas aplicações na indústria alimentar.

Designação e cor	Aplicação na indústria alimentar	Teor máximo (mg/kg)
Tartarazina (E102)	Queijos fundidos aromatizados	100
	Puré de ervilhas transformado e ervilhas (em conserva)	100
Amarela	Pastas de peixe e de crustáceos e peixe fumado,	100
	Crustáceos pré-cozidos.	250
	Vinho e bebidas aromatizadas à base de vinho.	100
Amarelo de quinoleína (E104)	Queijos fundidos aromatizados	100
	Pastas de peixe e de crustáceos	100
Amarelo-baço	Vinho e bebidas aromatizadas à base de vinho.	100
Amarante (E123)	Ovas de peixe.	30
	Bebidas espirituosas.	30
Vermelho	Vinhos aperitivos.	30
	Bebidas aromatizadas à base de vinho.	100
Eritrosina (E127)	Cerejas de cocktail e cerejas cristalizadas.	200
	Cerejas Bigarreaux em calda e em cocktail.	150
Azul brilhante FCF (E133)	Conservas de frutos vermelhos.	200
	Puré de ervilhas transformado e ervilhas (em conserva).	20
Azul	Carne não transformada.	<i>quantum satis</i>
	Bebidas alcoólicas com menos de 15% de álcool.	30
Verde S (E142)	Puré de ervilhas transformado e ervilhas (em conserva).	10
	Doces, geleias, marmeladas.	100
Verde	Pastas de barrar semelhantes de frutas e produtos hortícolas	100
	Pastas de peixe e de crustáceos.	100
	Crustáceos pré-cozidos.	250

Fonte: Jornal Oficial da União Europeia, 2011

Dos corantes artificiais permitidos na UE e listados no Anexo V do Regulamento (CE) nº 1333/2008 (2008), constam: amarelo-sol (E110), amarelo de quinoleína (E104), carmosina/azorubina (E122), vermelho allura (E129), tartarazina (E102) e ponceau 4R (E124). No entanto, a sua utilização está restrita à seguinte condição: toda a comida ou bebida que contenha qualquer uma destas substâncias deve conter no seu rótulo uma informação que apresente o nome ou número do(s) corante(s) seguido da frase “*pode causar efeitos negativos na atividade e na atenção das crianças*” (Carocho et al., 2014). Em suma, os corantes naturais apresentam maiores vantagens comparativamente com os artificiais, pois não têm efeitos secundários associados e a grande parte deles são

ingredientes funcionais, atuando como promotores de saúde (Martins et al., 2016). Contudo, não se devem generalizar as substituições de corantes artificiais por naturais, pois os segundos apresentam menor estabilidade, menor poder corante e maior probabilidade de interagirem com outros compostos (Sigurdson et al., 2017), tendo também que passar obrigatoriamente por todos os testes de segurança até chegar ao consumidor.

1.3.2. *Utilização de antocianinas*

Atualmente, o fácil acesso à informação leva a que os consumidores estejam mais atentos aos produtos que consomem e, conseqüentemente, optem por aqueles que não apresentam riscos para a sua saúde. Para que as necessidades e preferências dos consumidores continuem a ser tidas em conta, as indústrias têm investido na substituição de corantes artificiais por pigmentos naturais seguros. Com este objetivo, têm sido feitos muitos estudos a fim de desenvolver metodologias que permitam isolar e estabilizar os corantes obtidos através de matrizes naturais. Uma das classes de corantes naturais mais estudadas são as antocianinas, que tal como já referido, apresentam sensibilidade a inúmeras variáveis nomeadamente, luz, pH, temperatura, humidade, salinidade e condições de stresse (Martins et al., 2016).

A coloração das antocianinas depende maioritariamente do pH, apresentando uma disparidade significativa de cores, tal como representado na **Figura 11**. Em meio aquoso, apresentam cor vermelha a pH 1-3, são incolores a pH 4-5, roxas a pH 6-7, azuis a pH=7-8 e amarelas a pH 8-9 (Ananga et al., 2013).

Estas distintas colorações levam a um maior interesse da indústria, pois estes compostos podem ser incorporados em vários produtos desde que se garanta a sua estabilidade.

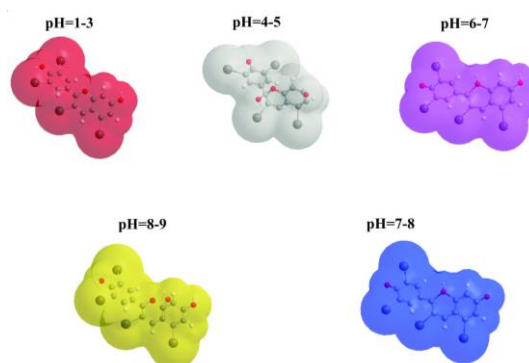


Figura 11. Cor das antocianinas dependendo do pH.
(Adaptado de Ananga et al., 2013).

A utilização das antocianinas como corantes alimentares está aprovada pela UE, pelos Estados Unidos (que as classifica como aditivos coloridos isentos de certificação) e pela Ásia (Gerardi et al., 2015). Segundo o Regulamento (UE) n.º 1129/2011 da Comissão, de 11 de novembro de 2011, estão autorizadas no processo de produção de queijos curados e produtos à base de queijos de pasta vermelha marmoreada (ou jaspeada), de conservas de frutos vermelhos, de produtos hortícolas em vinagre, óleo ou salmoura (exceto azeitonas), de doces, geleias e marmeladas de cereais para pequeno-almoço aromatizados com fruta, de pastas de peixe e de crustáceos, de crustáceos pré-cozidos e de peixe fumado. A sua DDA não está regulamentada, o que permite que seja adicionada ao produto alimentar a quantidade suficiente para se obter o efeito pretendido (Jornal Oficial da União Europeia, 2011).

De acordo com Cortez et al. (2017), têm sido realizados estudos de incorporação de antocianinas como corantes em alimentos e bebidas, particularmente, em produtos lácteos, como creme de queijo, leite fermentado, batidos, em bebidas de baixo pH, em panquecas e omeletes. Contudo, continuam a ser desenvolvidos mais estudos com o intuito de generalizar a utilização de antocianinas em produtos alimentares.

2. Objetivos

2. Objetivos

O presente estudo teve como principal objetivo caracterizar do ponto de vista químico e nutricional as folhas de *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* (manjeriço vermelho rubi), adquirido na empresa Cantinho das Aromáticas, Viveiros, Lda., sediada em Canidelo, Vila Nova de Gaia, Portugal. Foi também objetivo deste trabalho, proceder à avaliação das suas propriedades bioativas, através de vários ensaios *in vitro* testados no extrato hidroetanólico, realizado a partir de folhas de manjeriço vermelho rubi. Foram ainda efetuados estudos de otimização de metodologias para a obtenção de um extrato rico em antocianinas, a fim de ser utilizado como corante natural.

O plano de trabalho encontra-se esquematizado na **Figura 12**.

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

1. Determinação do valor nutricional das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens* através de metodologias oficiais de análise de alimentos (AOAC), analisando o teor em proteínas, cinzas, gordura, hidratos de carbono e energia;
2. Determinação da composição química utilizando técnicas cromatográficas acopladas a distintos detetores, analisando os açúcares livres, ácidos gordos, tocoferóis, ácidos orgânicos e compostos fenólicos;
3. Determinação do potencial bioativo no extrato hidroetanólico, através dos ensaios de atividade antioxidante, antimicrobiano, citotóxica, e hepatotóxica.
4. Otimização da extração de antocianinas das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*, realizada através de uma metodologia de extração assistida por calor, aplicando o método de análise de superfície de resposta.
5. Avaliação do potencial corante e bioativo do extrato otimizado rico em antocianinas obtidos a partir das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*.

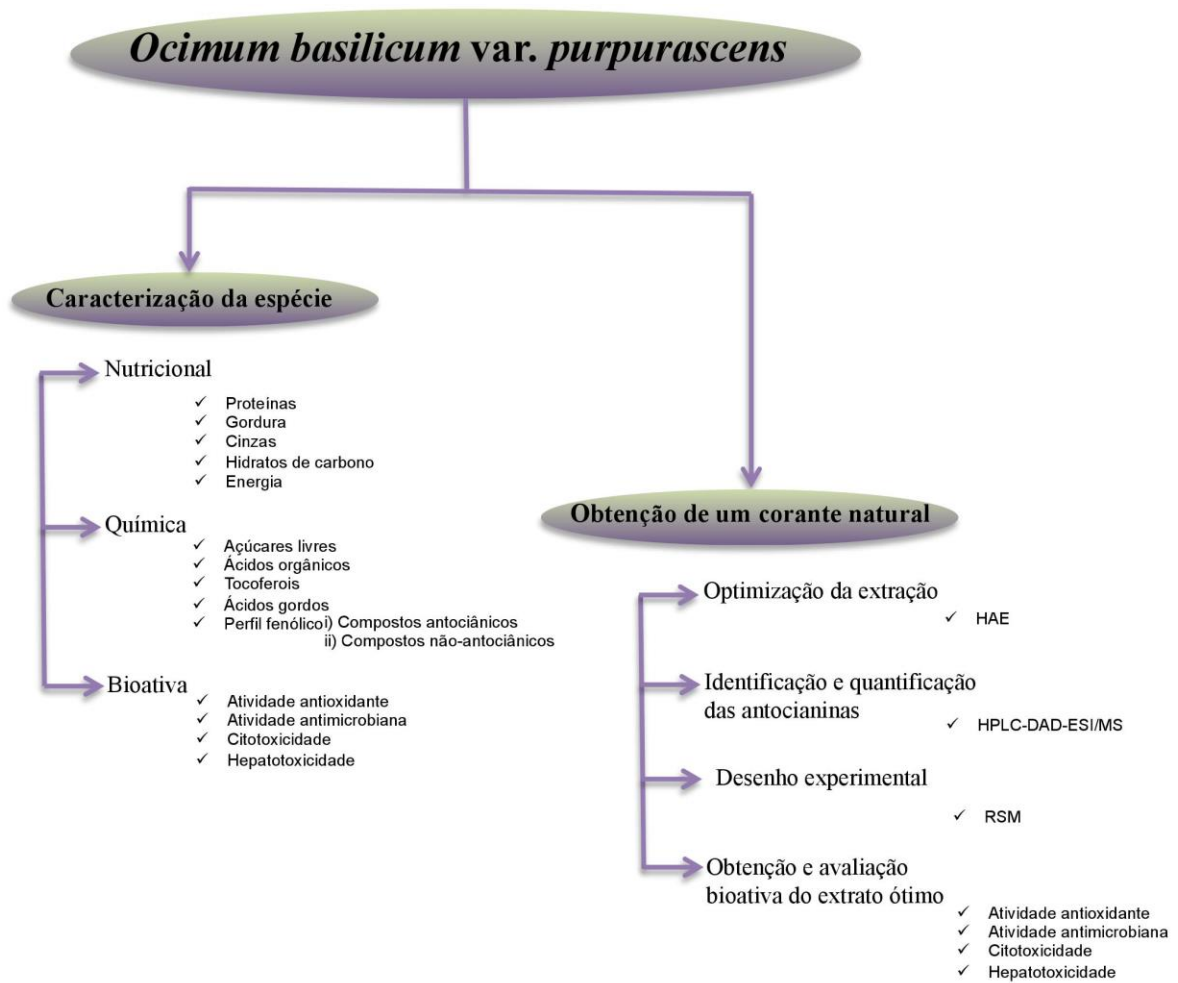


Figura 12. Esquematização do trabalho realizado na presente dissertação.

3. Material e Métodos

3.1. Amostra

As plantas *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* foram adquiridas na empresa Cantinho das Aromáticas, Viveiros, Lda., sediada em Canidelo, Vila Nova de Gaia, Portugal; colocadas a crescer numa estufa no Instituto Politécnico de Bragança e posteriormente, colhidas durante o mês de Setembro de 2017. As partes da planta foram separadas através de um procedimento mecânico, selecionando apenas as folhas frescas, que posteriormente foram desidratadas através do processo de liofilização (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, USA), reduzias a um pó fino (20 mesh) de forma a ficarem homogéneas, sendo armazenadas num local seco e ao abrigo da luz até posterior análise (Figura 13).



Figura 13. A- amostra fresca; B- amostra seca; C- amostra reduzida a pó.

3.2. Padrões e Reagentes

3.2.1. Para a análise química e nutricional

O acetonitrilo (99,9%), n-hexano (95%), etanol absoluto (99,9%) e acetato de etilo (99,8%), todos de grau HPLC, foram adquiridos na Fisher Scientific (Lisboa, Portugal). Por outro lado, a mistura padrão de referência de éster metílico de ácidos gordos (FAME) 37 (padrão 47885-U) foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), bem como os isómeros dos ácidos gordos individuais, tocoferóis (α -, β -, λ - e δ -isoformas), açúcares (D(-)-frutose, D(+)-sacarose, D(+)-glucose, D(+)-trealose, D(+)-rafinose penta-hidrato e D(+)-melezitose) e padrões de ácidos orgânicos (L(+)-ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido chiquímico, ácido succínico, ácido fumárico, e

ácido quínico). O tocol racêmico, 50 mg/mL, foi comprado na Matreya (Pleasant Gap, PA, USA) e a água foi tratada num sistema de purificação e água Milli-Q (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, USA). 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). O tratamento da água foi feito através de um sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, USA).

3.2.2. *Para o estudo das bioatividades*

Atividade antioxidante: O padrão trolox (ácido 6-hydroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico), β -caroteno e ácido linoleico foram adquiridos na empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) foi obtido na empresa Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA) e o Tween 80 na empresa Panreac (Barcelona, Espanha).

Atividade antimicrobiana: Mueller-Hinton agar (MH) e o malte agar (MA) foram obtidos no Institute of Immunology and Virology, Torlak (Belgrade, Serbia). O composto *p*-iodonitrotetrazolium chloride (INT) foi adquirido da Panreac Applichem (Barcelona, Espanha).

Potencial citotóxico: O sêrum fetal de bovino (FBS), a L-glutamina, a solução salina de Hank's (HBSS), a trypsin-EDTA (ácido etilenediaminatetra acético), a solução de penicilina/streptomicina (100 U/mL e 100 mg/mL), o RPMI-1640 (meio Roswell Park Memorial Institute) e o meio DMEM (meio de cultura para células animais (*Dulbecco Modified Eagle*)) foram fornecidos pela empresa Hyclone (Logan, UT, USA). O ácido acético, ácido fórmico, elipticina, sulforrodamina B (SRB), azul de trypan, ácido tricloroacético e Tris foram obtidos na empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

3.3. Determinação da cor

Os parâmetros de cor foram avaliados conforme descrito anteriormente por Pereira et al. (2015b), utilizando um colorímetro (modelo CR-400, Konica Minolta Sensing, Inc., Japão), com um adaptador (modelo CR-A50) para materiais granulares. As medições foram feitas no espaço de cor CIE $L^* a^* b^*$ usando o iluminante C e uma abertura de diafragma de 8 mm; os dados foram processados com o software “Spectra Magic Nx” (versão CM-S100W 2.03.0006), da empresa Konica Minolta (Japão). Antes de iniciar as medições, o instrumento foi calibrado contra um azulejo branco - padrão. A cor de três amostras de cada lote foi medida em três pontos diferentes, sendo considerado o valor médio.

3.4. Determinação do valor nutricional e composição química

3.4.1. Valor nutricional

A composição em macronutrientes das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens* foi determinada através de metodologias oficiais de análise de alimentos (AOAC, 2016).

A determinação da humidade presente na amostra, foi feita colocando uma quantidade conhecida de amostra (1 g) numa estufa a 105 °C, durante o período de tempo necessário para obter uma massa constante.

O teor em proteínas ($N \times 6.25$) foi determinado pelo método macro-Kjeldahl (AOAC 991.02), baseando-se na quantidade de azoto presente na amostra e na destruição de toda a matéria orgânica pela adição de um ácido forte (ácido sulfúrico) que retém o azoto sob a forma de $(NH_4)_2SO_4$. A adição de NaOH liberta o azoto como NH_3 que é coletado por destilação a vapor numa solução de H_2SO_4 0,1N; seguidamente é feita uma titulação com NaOH 0,1N, usando vermelho de metilo como indicador para calcular a quantidade de azoto.

Os teor lipídico foi determinado pela extração de uma massa conhecida da amostra liofilizada (3 g) com éter de petróleo, a 80 °C, durante cerca de 7-8 horas, usando um aparelho de Soxhlet (**Figura 14**), sendo posteriormente evaporada a fração volátil, o extrato resultante foi posteriormente colocado numa estufa até peso constante, de forma a determinar o teor em gorduras (AOAC 989.05).



Figura 14. Extração por soxhlet.

O teor em cinzas foi determinado por incineração numa mufla a $550 \pm 15^\circ\text{C}$, durante 12 horas (AOAC 935.42).

Os glúcidos foram determinados por diferença e a energia total foi determinada de acordo com a **Equação 1**:

$$\text{Energia (kcal)} = 4 \times (\text{g}_{\text{proteínas}} + \text{g}_{\text{glúcidos}}) + 9 \times (\text{g}_{\text{lípidos}}).$$

Equação 1. Equação para determinar a energia total.

3.4.2. *Composição química*

3.4.2.1. *Açúcares*

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI). À amostra (1.0 g) foi adicionado um padrão interno - a melezitose (PI, 25 mg/mL), e a extração foi efetuada com 40 mL de uma solução etanol/água (80:20, v/v), durante 1h 30 min. A suspensão resultante foi centrifugada (centrífuga refrigerada: Centurion K24OR, West Sussex, UK) a 15.000g durante 10 min e a fração etanólica foi evaporada (rotary evaporator Büchi R-210, Flawil, Switzerland) a 35 °C sob pressão reduzida. A fração aquosa foi desengordurada três vezes com 10 mL de éter etílico, sucessivamente (**Figura 15**). Após

a concentração a 40 °C, os resíduos sólidos foram dissolvidos em água para um volume final de 5 mL e filtrados através de filtros de nylon (Whatman de 0,2 µm) para um vial âmbar, para posterior análise (Pinela et al., 2011).



Figura 15. Processo de lavagem da fração aquosa.

O equipamento de HPLC consistia num sistema integrado com uma bomba (Knauer, sistema Smartline 1000, Berlim, Alemanha), um sistema desgaseificador (Smartline manager 5000), um amostrador automático (AS-2057 Jasco, Easton, MD, EUA) e um detetor de índice de refração (IR) (Knauer Smartline 2300).

A análise de dados foi feita usando o software Clarity 2.4 (DataApex) e a separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Eurospher 100-5 NH₂ (4,6 x 250 mm, 5 µm, Knauer) operando a 35 °C (forno 7971 R Grace). A fase móvel usada foi acetonitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v), a um caudal de 1 mL/min e um volume de injeção de 10 µL.

A identificação dos compostos foi realizada através de comparações cromatográficas com padrões autênticos. A quantificação foi efetuada aplicando o método do padrão interno e os teores de açúcar foram expressos em g por 100 g de massa fresca (mf).

3.4.2.2. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos foram determinados utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a um detetor de díodos (UFLC-DAD). As amostras (aproximadamente 1 g) foram extraídas por maceração com 25 mL de ácido metafosfórico (25 °C a 150 rpm) durante 20 min. Subsequentemente a mistura foi

centrifugada (4000g, 10 min) e posteriormente filtrada através de filtros de nylon (Whatman, 0.2 µm) para um frasco de 1,5 mL (Barros et al., 2013a).

A análise foi realizada usando uma série UFLC Shimadzu 20A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). A separação foi feita numa coluna C₁₈ de fase reversa SphereClone (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) termostaticada a 35 °C e a eluição foi efetuada com ácido sulfúrico (3,6 mM), usando um caudal de 0,8 mL/min, e um volume de injeção de 20 µL.

A deteção foi realizada através de um DAD, usando como comprimentos de onda 215 e 245 nm. Os ácidos orgânicos encontrados foram quantificados por comparação da área dos picos registados a 215 nm e 245 nm (para ácido ascórbico) com curvas de calibração obtidas a partir dos padrões comerciais de cada composto. Os resultados foram expressos em g por 100 g de massa fresca.

3.4.2.3. *Tocoferóis*

Os tocoferóis foram determinados por HPLC (equipamento descrito na *secção 3.4.2.1*) acoplado a um detetor de fluorescência (FP-2020; Jasco). Antes do procedimento de extração, foi adicionado à amostra (500 mg) uma solução de BHT em hexano (10 mg/mL; 100 µL) e uma solução PI (padrão interno) em hexano (tocol; 50 µg/mL; 400 µL). A referida mistura foi homogeneizada com metanol (4 mL) recorrendo ao vortex, durante 1 minuto. Subsequentemente, foi adicionado hexano (4 mL), misturando novamente (vortex durante 1 min). De seguida, foi adicionado uma solução aquosa concentrada de NaCl (2 mL) que foi homogeneizada com a mistura anterior (vortex, 1min) e foi centrifugada (Centurion K24OR, West Sussex, UK) durante 5 min, com uma velocidade de 4000 g. O sobrenadante obtido foi, cuidadosamente, transferido para um vial, adicionando-se sulfato de sódio anidro, e a amostra foi re-extraída novamente (2 vezes) com hexano. Os extratos combinados foram levados à secura sob fluxo de azoto (**Figura 16**), redissolvidos em 2 mL de n-hexano, filtrados com filtros de nylon de 0,2 mm (Whatman; Maidstone, Reino Unido) e transferidos para um vial âmbar para posterior análise (Pinela et al., 2011).



Figura 16. Secagem dos extratos sob fluxo de azoto.

O detetor de fluorescência foi programado para excitação (λ_{ex}) a 290 nm e emissão (λ_{em}) a 330 nm. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna de fase normal de poliamida II (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 μ m, YMC Waters, Florida, EUA), operando a 35 °C. A fase móvel utilizada foi uma mistura de n-hexano/acetato de etilo (70:30, v/v) com um fluxo de 1 mL/min, e o volume de injeção foi de 10 μ L.

Os compostos foram identificados por comparações cromatográficas com padrões autênticos e a quantificação foi baseada em curvas de calibração obtidas de padrões comerciais de cada composto usando o método do padrão interno (PI). Os resultados foram expressos em mg por 100 g de massa fresca (mf).

3.4.2.4. Ácidos Gordos

A determinação do perfil de ácidos gordos foi realizada através de um sistema de cromatografia gasosa acoplado a um detetor de ionização de chama (GC-FID) seguindo um procedimento descrito anteriormente por Barros et al. (2013b).

A massa obtida por extração em Soxhlet foi misturada com 5 mL de metanol: ácido sulfúrico: tolueno 2:1:1 (v/v/v), durante pelo menos 12 h, num banho (Julabo, SW22; Seelbach, Germany) a 50 °C e a 160 rpm; de seguida, adicionaram-se 3 mL de água desionizada, para obter a separação das fases. O FAME foi recuperado com 3 mL de éter etílico, após agitação no vórtex, recuperou-se a amostra para um frasco com teflon e colocou-se sulfato de sódio anidro, a fim de eliminar a água. Posteriormente filtrou-se a amostra com um filtro de nylon 0,2 μ m (Whatman) para um vial de 1,5 mL.

O perfil de ácidos gordos foi analisado através de um sistema de GC (DANI 1000) equipado com um injetor split/splitless, detetor de ionização de chama (FID) e uma coluna Macherey Nagel (30 m x 0,32 mm d.i x 0,25 μ m df). O programa da temperatura do forno foi: temperatura inicial da coluna de 50 °C, mantida por 2 min, depois uma subida de 30 °C/min a 125 °C, 5 °C/min de subida para 160 °C, 20 °C/min de subida para 180 °C, 3

°C/min subida até 200 °C, 20 °C/min subida até 220 °C e mantido por 15 min. O fluxo de hidrogénio (gás de arraste) foi de 4,0 mL/min (0,61 bar), medido a 50 °C. A injeção de split (1:40) foi realizada a 250 °C.

Para cada análise, injetou-se 0,1 µL da amostra e a identificação dos ácidos gordos foi feita comparando os tempos de retenção relativos dos picos FAME das amostras com os padrões. Os resultados foram registados e processados usando o Software CSW 1.7 (DataApex 1.7, Praga, República Tcheca) e expressos em percentagem relativa (%) de cada ácido gordo.

3.4.2.5. Determinação do perfil de compostos fenólicos

3.4.2.5.1. Compostos fenólicos não-antociânicos

Processo de extração. Pesou-se aproximadamente 1 g de folhas secas de *O. basilicum* var. *purpurascens* e adicionou-se 30 mL de uma solução etanol/água (80:20, v/v), ficando a mistura a macerar durante 1 hora, sobre agitação. Após o processo de maceração o sobrenadante foi filtrado utilizando papel de filtro (Whatman N°4) e o resíduo foi re-extraído adicionando novamente, 30 mL da mesma mistura de solvente. A fração etanólica do extrato foi evaporada a 40 °C (Büchi R-210, Flawil, Switzerland), resultando uma fração aquosa que foi posteriormente congelada e liofilizada (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, USA). O extrato liofilizado (10 mg) foi redissolvido em 2 mL de etanol/água (20:80, v/v) de forma a obter uma concentração final de 5 mg/mL, para posterior análise num sistema de HPLC-DAD-ESI/MS (Pereira et al., 2016).

Método analítico. A análise foi feita utilizando um sistema Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) 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 um detetor de díodos (DAD), usando os comprimentos de onda de 280 nm, 330 nm e 370 nm, e com um detetor de espectrometria de massa (MS).

Para a separação cromatográfica foi usada uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (3 µm, 4.6 mm × 150 mm, Waters, Milford, MA, USA), a 35 °C. A fase

móvel foi 0,1% de ácido fórmico em água (A) e acetonitrilo (B). O gradiente de eluição foi de 15% B (5 min), 15% B a 20% B (5 min), 20-25% B (10 min), 25-35% B (10 min), 35-50% B (10 min), e a coluna foi reequilibrada (10 min), empregando um fluxo de 0,5 mL/min.

A detecção de MS foi feita utilizando uma espectrómetro de massa Ion Trap Linear LTQ (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA), equipado com uma fonte ESI (fonte de ionização electrospray). O gás de arraste usado foi o azoto (50 psi); o sistema trabalhou a uma voltagem de spray de 5 kV, com 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 aplicada foi de 35 (unidades arbitrárias). Os dados foram recolhidos e analisados usando o programa Xcalibur® (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA).

A identificação dos compostos foi feita através da informação obtida (tempos de retenção, e espectros UV-Vis e massa) por comparação com compostos padrão, quando disponíveis, ou utilizando dados obtidos através da literatura. Para a quantificação obtiveram-se as curvas de calibração por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas (2,5-100 µg/mL): taxifolin ($y = 203766x - 208383$; $R^2 = 1$); naringenin ($y = 18433x + 78903$; $R^2 = 0.9998$); caffeic acid ($y = 388345x + 406369$; $R^2 = 0.994$); rosmarinic acid ($y = 191291x - 652903$; $R^2 = 0.999$); 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 por g de extrato.

3.4.2.5.2. Compostos fenólicos antociânicos

Extração. Foi realizada uma extração por maceração, utilizando 1g de amostra de folhas (*O. basilicum* var. *purpurascens*) onde foram adicionados 30 mL de etanol/água (80:20 v/v) acidificado com 0,5 % de TFA (ácido trifluoroacético). O sobrenadante obtido foi filtrado (papel Whatman N°4) e o resíduo foi re-extraído com 30 mL da mesma solução acidificada. Posteriormente, a fração etanólica foi evaporada a 40 °C (evaporador rotativo; Büchi R-210, Flawil, Switzerland), resultando uma fração aquosa que foi depois

congelada e liofilizada (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, USA) (**Figura 17**). O extrato liofilizado (10 mg) foi re-dissolvido em 2 mL de uma solução de etanol/água (20:80, v/v, 1 mL) acidificado com 0,01% de TFA de forma a obter uma concentração final de 5 mg/mL. Seguidamente, filtrado através de discos LC descartáveis de 0,22- μ m para um frasco de 1,5 mL para posterior análise em HPLC.

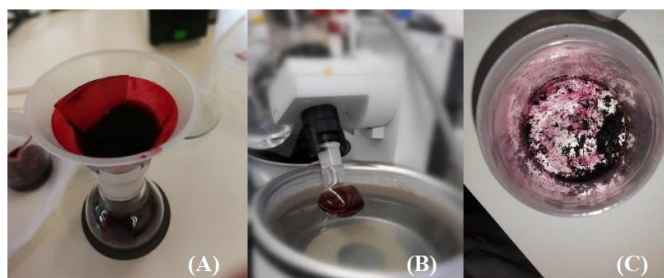


Figura 17. Etapas do processo de extração: A) filtração; B) evaporação e C) extrato liofilizado.

Método analítico. A análise foi efetuada num sistema Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific) descrito em 3.4.2.5.1.. A deteção dos compostos antociânicos foi efetuada com detetor de díodos (DAD) a 520 nm, acoplado a um detetor de espectrometria de massa (MS).

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna AQUA® (150 mm x 4.6 mm i.d., 5 μ m, Phenomenex, Torrance, California, EUA) de fase reversa. A fase móvel foi 0,1% TFA em água (A) e 100% acetonitrilo (B). O gradiente de eluição foi de 10% B até 3 min, 10 a 15% B mais 12 min, isocrático 15% B mais 5 min, 15 a 18% B mais 5 min, 18 a 30% B mais 20 min e 30 a 35% mais 5 min. A coluna foi reequilibrada durante 10 min e o um caudal utilizado foi de 0,5 mL/min.

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

A caracterização dos compostos antociânicos foi efetuada de acordo com os seus espectros (UV-Vis e massa) e tempos de retenção por comparação com padrões, quando disponíveis, ou utilizando dados obtidos através da literatura. Para a quantificação, foi obtida curvas de calibração por meio da injeção de padrões de concentrações conhecidas (200-0,25 µg/mL) de cianidina 3-glucósido ($y = 97787x - 743469$; $R^2 = 0.9993$) e de pelargonidina 3-glicósido ($y = 43781x - 275315$; $R^2 = 0.9989$), baseadas nos sinais UV-Vis e utilizando o comprimento de onda máximo de absorção de cada composto padrão. Os resultados foram expressos em mg por g de extrato fresco.

3.5. Avaliação do potencial bioativo

3.5.1. *Preparação do extrato hidroetanólico*

A extração foi realizada de acordo com o descrito anteriormente na *secção 3.4.2.5.1.* O extrato liofilizado foi re-dissolvido numa concentração de 10 mg/mL em etanol/água (80:20, v/v) para os ensaios atividade antioxidante (*secção 3.5.2.*), em meio de cultura (10 mg/mL) para a análise da atividade antimicrobiana (*secção 3.5.3.*) e em água destilada numa concentração de 8 mg/mL para avaliação da atividade citotóxica (*secção 3.5.4.*) e hepatotoxicidade (*secção 3.5.5.*). Posteriormente, estas soluções foram diluídas sucessivamente de forma a obter as concentrações de trabalho.

3.5.2. *Atividade antioxidante*

3.5.2.1. *Atividade captadora de radicais livres (DPPH)*

Numa microplaca de 96 poços (**Figura 18**) foram colocados 30 µL de extrato hidroetanólico de *O. basilicum* var. *purpurascens* com diferentes concentrações, ao qual se adicionou uma solução metanólica de DPPH (6×10^{-5} mol/L; 270 µL). Seguidamente, a placa foi colocada ao abrigo da luz durante 60 minutos para os valores de absorvância estabilizarem, uma vez que a redução do radical DPPH é avaliada pela medição da absorvância a 515 nm, num leitor de microplacas (Bio-Tek ELX800; Bio-Tek Instruments Inc., Vermont, EUA).

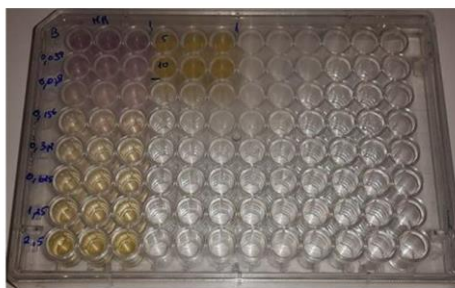


Figura 18. Determinação da atividade captadora de radicais livres.

A atividade captadora de radicais livres (RSA) foi calculada usando a **Equação 2**:

$$\% \text{ RSA} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{S}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

Equação 2. Equação para determinação de RSA no método DPPH.

Onde:

A_{S} é a absorvância da solução na presença de extrato numa determinada concentração

A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH.

A concentração de extrato correspondente a 50% de atividade captadora de radicais (EC_{50}) foi calculada a partir da representação gráfica da percentagem de RSA em função da concentração do extrato. O controlo utilizado neste ensaio foi o trolox (Barros et al., 2010).

Fundamento teórico

Os radicais livres são átomos, moléculas ou iões com eletrões desemparelhados que são altamente instáveis e ativos para reações químicas com outras moléculas. Eles derivam de três elementos: oxigênio, azoto e enxofre, criando espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de azoto (RNS) e espécies reativas de enxofre (RSS) (Carocho & Ferreira, 2013).

O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) é um radical de azoto orgânico estável, que se encontra disponível comercialmente, e que apresenta cor púrpura intensa com um máximo de absorção a 517 nm. Este radical reage com compostos que tenham capacidade de doar um átomo de hidrogénio. Quando o DPPH^{\bullet} capta o átomo de hidrogénio de um antioxidante há uma descoloração da solução de DPPH, ou seja, vai-se formar hidrazina

que apresenta uma cor amarela com absorção a 517 nm e vai diminuindo a sua absorvância (**Figura 19**) (Amarowicz et al., 2004; Moon & Shibamoto, 2009). A atividade captadora de radicais é então calculada como percentagem da descoloração da solução de DPPH.

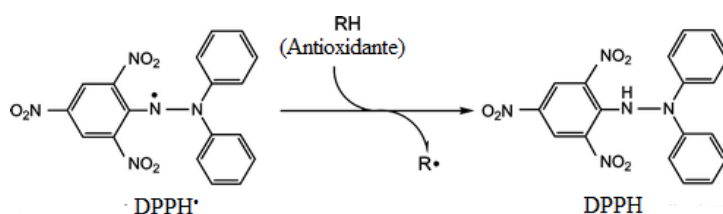


Figura 19. Processo de capturação de radicais livres.
Fonte: Adaptada de Moon & Shibamoto, (2009).

3.5.2.2. Poder redutor

Esta metodologia foi realizada utilizando o leitor de microplacas anteriormente descrito. As soluções de extrato com diferentes concentrações (0,5 mL) foram misturadas com tampão fosfato de sódio (200 mmol/L; pH 6,6; 0,5 mL) e ferricianeto de potássio (1 % *m/v*; 0,5 mL). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min, tendo sido de seguida adicionado ácido tricloroacético (10% *m/v*; 0,5 mL). A mistura (0,8 mL) foi colocada numa microplacas de 48 poços (**Figura 20**), assim como, a água desionizada (0,8 mL) e o cloreto de ferro (0,1% *m/v*; 0,16 mL), sendo posteriormente medida a absorvância a 690 nm.

A concentração de extrato que fornece 0,5 de absorvância (EC₅₀ - 50% do valor máximo de absorvância no qual se aplica a Lei de Lambert-Beer) foi calculada a partir da representação gráfica da absorvância a 690 nm em função da concentração do extrato. Neste ensaio foi usado o trolox como controlo (Barros et al., 2010).

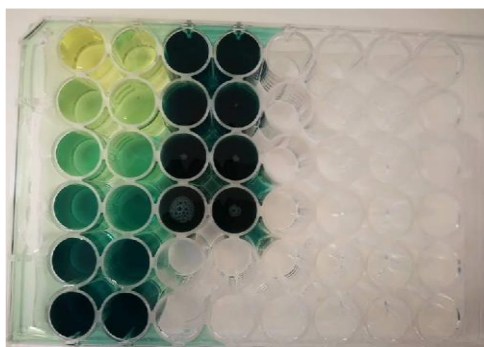
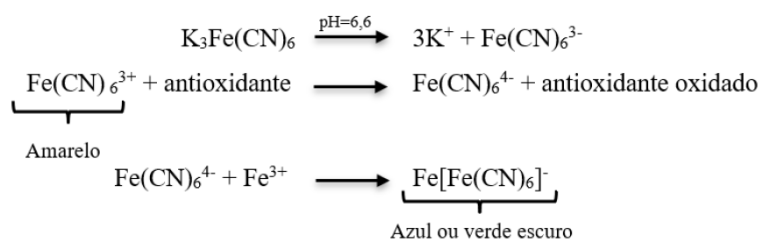


Figura 20. Exemplo de uma microplaca na parte final do ensaio do poder redutor.

Fundamento teórico

Este ensaio tem por base a medição da capacidade dos antioxidantes para reduzir o complexo Fe^{3+} /ferricianeto $[\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ na forma ferrosa Fe^{2+} (Moon & Shibamoto, 2009). Dependendo do poder redutor dos compostos a cor da solução do ensaio modifica-se de amarelo para vários tons de verde ou azul, podendo ser medida com um espectrofotómetro a 690-700 nm (Amarowicz et al., 2004; Ferreira et al., 2006).

De acordo com Berker et al., (2007), a química dos ensaios baseados no ferro pode ser resumida pelas seguintes reações (**Equação 3**):



Equação 3. Equações químicas do ensaio do poder redutor.

3.5.2.3. Inibição da descoloração do β -caroteno

Preparou-se uma solução de β -caroteno por dissolução de β -caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 mL) e pipetou-se 2 mL para um balão de fundo redondo. Posteriormente o clorofórmio foi evaporado a 40 °C num evaporador rotativo (Büchi R-210, Flawil, Switzerland) e foi adicionado emulsificante Tween 80 (400 mg), ácido linoleico (40 mg) e água destilada (100 mL), agitando-se vigorosamente.

Posteriormente, adicionou-se 0,2 mL de soluções com diferentes concentrações de extrato e 4,8 mL da solução previamente preparada em tubos de ensaio. A mistura foi homogeneizada, lida no espectrofotômetro (Specord 250, AnalytikJena) a 470 nm e colocada a incubar a 50 °C, com agitação de 50 rpm, durante 2 horas (**Figura 21**). Após esse tempo, voltou-se a fazer a leitura no espectrofotômetro descrito anteriormente.

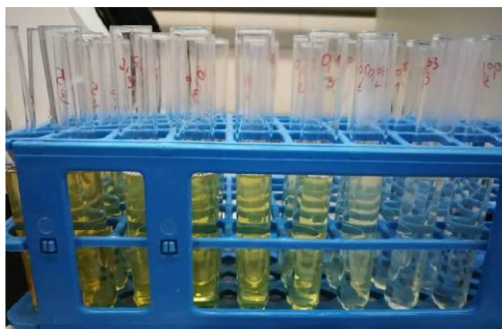


Figura 21. Ensaio de inibição da descoloração de β -caroteno.

A inibição da descoloração do β -caroteno foi calculada utilizando a seguinte **Equação 4**:

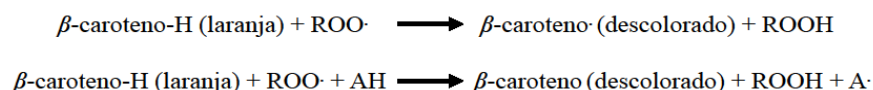
$$\text{Inibição da descoloração do } \beta - \text{ caroteno} = \frac{\text{Conteúdo de } \beta - \text{ caroteno após 2h}}{\text{Conteúdo inicial de } \beta - \text{ caroteno}} \times 100$$

Equação 4. Equação do ensaio de inibição da descoloração do β -caroteno.

A concentração de extrato que origina 50% de atividade antioxidante (EC_{50}) foi calculada por interpolação a partir do gráfico de percentagem da inibição da descoloração do β -caroteno em função da concentração de extrato. Foi usado o trolox como controle (Barros et al., 2010).

Fundamento teórico

Este ensaio consiste na descoloração (oxidação) do β -caroteno (**Equação 5**) na ausência de um antioxidante e avalia a atividade de inibição de radicais livres, que são gerados durante a peroxidação do ácido linoleico, através da leitura da absorvância a 470 nm. A presença de antioxidantes numa amostra inibe ou reduz a descoloração da solução com o β -caroteno, tal como se mostra nas seguintes equações (Amarowicz et al., 2004; Moon & Shibamoto, 2009):



Equação 5. Equações químicas do ensaio de β -caroteno.

3.5.3. *Atividade antimicrobiana*

3.5.3.1. *Atividade antibacteriana*

Para avaliação da atividade antibacteriana seguiu-se a metodologia descrita anteriormente por Carochi et al. (2015a). Utilizaram-se bactérias Gram-negativas como: *Enterobacter cloacae* (ATCC - American type culture collection 35030), *Escherichia coli* (ATCC 35210) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) e bactérias Gram-positivas *Bacillus cereus* (clinical isolate), *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. As concentrações mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB) foram determinadas usando o método de microdiluição.

As culturas de bactérias foram ajustadas através do espectrofotômetro ficando com uma concentração de 1×10^5 CFU/mL, correspondendo a uma suspensão bacteriana determinada num espectrofotômetro 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 μ L de caldo de soja tríptico (TSB) e, posteriormente, foram adicionados 10 μ L 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 μ L de cloreto de iodonitrotetrazólio (INT) (0,2 mg/mL) e incubou-se a 37 °C durante 30 min. As CMIs 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 MBC foram expressos em mg por mL de extrato hidroetanólico liofilizado.

3.5.3.2. Atividade antifúngica

Para a avaliação da atividade antifúngica foi seguido o procedimento descrito anteriormente por Carochi et al. (2015a). Para tal, foram utilizados os microrganismos *Aspergillus fumigatus* (ATCC 1022), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Aspergillus ochraceus* (ATCC 12066), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *P. ochrochloron* (ATCC 9112) e *P. verrucosum* var. *cyclopium* (food isolate). 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 MIC 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 fúngicas (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 controle negativo, enquanto o

bifonazol e o cetoconazol foram utilizados como controlos positivos. Os resultados de CMI e CMF foram expressos em mg por mL de extrato hidroetanólico.

3.5.4. *Avaliação da citotoxicidade em linhas celulares tumorais*

A avaliação do potencial citotóxico do extrato hidroetanólico (80:20, v/v) das folhas de manjerição vermelho rubi foi realizada através do ensaio da Sulfarrodamina B (SRB), previamente descrito por Barros et al. (2013b).

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 % CO₂.

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% CO₂ (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 (1.0×10^4 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 $\mu\text{g/mL}$) 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_{50} (concentração de amostra que inibe 50% de crescimento celular) em unidades de $\mu\text{g/mL}$.

A **Figura 22** é um exemplo representativo de uma microplaca após efetuar todos os passos mencionados acima, de forma a efetuar a medição de citotoxicidade.

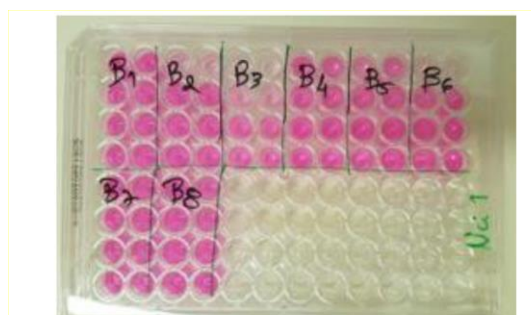


Figura 22. Ensaio de citotoxicidade.

3.5.5. Avaliação da hepatotoxicidade em células não tumorais

Neste ensaio 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 mm³. Alguns destes explantes foram colocados em frascos de 25 cm² 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 CO₂. 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 (1,0x10⁴ células/poço), juntamente com 10 µL das diferentes diluições do extrato, mencionado na *secção 3.5.4.* (400 a 6,25 µg/mL), incubando-se a 37°C por 48 horas. Em seguida, efetuou-se o ensaio SRB anteriormente descrito (*secção 3.5.4.*). A elipticina foi utilizada como controlo positivo e os resultados foram expressos em GI₅₀ (concentração de amostra que inibe 50% de crescimento celular em cultura de células PLP2) em unidades de µg/mL.

3.6. Otimização do processo de obtenção de um corante à base de antocianinas das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*

3.6.1. Extração assistida por calor (HAE)

A extração assistida por calor (HAE) consiste na extração de moléculas de uma amostra em pó, utilizando um solvente acidificado, sob condições definidas de temperatura e agitação (Wang et al., 2016). Esta técnica prima pela facilidade de empregabilidade no sector industrial, uma vez que se caracteriza pela simplicidade e pelo número reduzido de equipamentos necessários para a sua execução (Roriz et al., 2017; Backes et al., 2018; López et al., 2018).

O procedimento de extração foi realizado em banho-maria, recorrendo a um agitador magnético (Cimarec™, Thermo Scientific), sob uma velocidade fixa (500 rpm),

e utilizando frascos fechados de modo a evitar-se a evaporação do solvente (**Figura 23**). Para a realização da extração 20 mL de solvente (etanol e água) acidificado com ácido cítrico (pH \approx 3) foram adicionados a 300 mg de amostra em pó (folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*). Este procedimento realizou-se seguindo as condições de extração predefinidas pelo modelo MSR estabelecido (**Tabela 7, secção 3.6.5.1.**: tempo (t ou X_1 , 40 a 120 min), temperatura (T ou X_2 , 25 a 85°C) e teor de etanol (S ou X_3 , 0 a 100%). A relação sólido-líquido (S/L ou X_4) foi mantida a 15 g/L.



Figura 23. HAE de compostos antociânicos.

3.6.2. *Preparação dos extratos obtidos por HAE*

Posteriormente ao processo de extração, as soluções de extrato foram centrifugadas (10000 rpm, durante 5 minutos a 10 °C) e filtradas através de papel de filtro (Whatman nº4), a fim de remover os sólidos em suspensão. O sobrenadante foi colhido 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 μ m) e de seguida, injetada. A segunda fração, foi recolhida para determinação do rendimento de extração (5 mL), passando por processo de secagem com uma temperatura de 105 °C durante 48 horas, para posterior pesagem dos sólidos (**Figura 24**).



Figura 24. Ilustração do processamento da amostra após extração por HAE.

3.6.3. *Identificação e quantificação de compostos antociânicos através de um sistema de HPLC-DAD-ESI/MS*

A análise do extrato corante rico em compostos antociânicos, obtido pelo processo de HAE, foi realizada por um sistema Dionex Ultimate 3000 HPLC (Thermo Scientific), descrito anteriormente na *seção 3.4.2.5.2.*

3.6.4. *Formato dos valores de resposta para processos analíticos*

A concentração dos treze compostos antociânicos identificados na *seção 4.3.2.* (*P1* a *P13*) e a sua soma (*TCA*) foram utilizadas como respostas. A expressão dos resultados recaiu sobre dois formatos de resposta (*Y*): Y_1 , em mg de A por grama de resíduo extraído (mg/g E), que foi usado para avaliar a pureza das antocianinas nos extratos e Y_2 , a quantidade de resíduo extraído expresso por *Rendimento* (%).

3.6.5. *Desenho experimental, análise de modelos e avaliação estatística*

3.6.5.1. *Desenho experimental MSR*

Os ensaios foram realizados baseados na análise de cada uma das variáveis, selecionando as que originaram efeitos significativos, bem como os intervalos relevantes (**Tabela 7**). Os efeitos combinados das três variáveis definidas foram estudados utilizando um *desenho composto central circunscrito (DCCC)*, com o uso de cinco níveis para cada um, com vinte e oito combinações de respostas (Helena et al., 2016).

Tabela 7. Delineamento experimental e codificação das variáveis independentes usadas no desenho fatorial CCCD com 5 níveis.

VALORES CODIFICADOS	VALORES NATURAIS		
	$X_1: t \text{ (min)}$	$X_2: T \text{ (}^\circ\text{C)}$	$X_3: S \text{ (%)}$
-1.68	20	25	0
-1	40,3	37,2	20,3
0	70	55	50
+1	99,7	72,8	79,7
+1.68	120	85	100

3.6.5.2. Modelo Matemático

O ajuste dos dados de MSR foi feito através do cálculo dos mínimos quadrados, recorrendo à equação polinomial de segunda ordem (**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.

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, utilizaram-se os dois formatos de valores: Y_1 (mg/g E) e Y_2 *Rendimento* (%).

3.6.5.3. Procedimento de otimização das variáveis de forma a maximizar a resposta

Para a otimização do modelo de previsão utilizou-se um método *simplex*, que resolveu problemas não lineares, maximizando o rendimento de extração e a recuperação de antocianinas (Vieira et al., 2017). Para evitar variáveis com condições físicas não naturais e irrealistas, foram impostas algumas limitações às variáveis codificadas (nomeadamente $t \geq 0$).

3.6.5.4. *Análise de cluster*

Foi realizada uma análise de cluster de forma a agrupar os compostos de antociânicos de acordo com as condições de extração que maximizam os seus valores de resposta, usando o “XLSTAT 2016”, um suplemento do Microsoft Excel.

Foi usada uma análise hierárquica de cluster (HCA) com coeficiente de correlação de Pearson, para fazer esse agrupamento (análise de similaridade). O algoritmo utilizado foi uma ligação completa com o truncamento automático baseado na entropia.

3.6.5.5. *Análise dose-resposta da relação sólido-líquido*

O padrão da razão sólido-líquido é um importante parâmetro a determinar, a fim de se obter um processo com maior produtividade e sustentabilidade. Deste modo, após a otimização das condições experimentais (previamente definidas como X_1 , X_2 e X_3), procedeu-se ao estudo da razão sólido-líquido S/L (ou X_4 ; expressa em g/L). Para a representação do efeito resposta, em função da relação sólido-líquido, usou-se uma equação linear com ordenada na origem, dado que, os pontos seguem uma distribuição linear à medida que o S/L aumenta. O valor paramétrico do declive (m) foi usado para avaliação da dose resposta. Nesta avaliação, valores positivos indicam um aumento nas respostas de extração, enquanto que, valores negativos indicam uma diminuição na eficiência de extração, ambos resultantes de um aumento de S/L .

3.6.6. *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 macro ‘*Solver*’ introduzida no Microsoft Excel, para minimizar as diferenças entre os valores obtidos e os valores previstos pelo modelo;
- b) a significância dos coeficientes foi avaliada através da macro ‘*SolverAid*’, 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) a macro '*SolverStat*' foi aplicada para determinar as incertezas na previsão dos parâmetros e modelos (Murado & Prieto, 2013); iii) o R^2 foi interpretado como a proporção de variabilidade da variável dependente explicada pelo modelo.

3.7. Preparação do extrato rico em compostos antociânicos obtido nas condições ótimas a partir das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*

De forma a alcançar um extrato rico em compostos antociânicos, particularmente, derivados de cianidina e pelargonidina, realizou-se uma extração a partir das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*, seguindo o procedimento previamente otimizado e descrito na **seção 4.5.2., Tabela 16**. A amostra (300 mg) foi colocada juntamente com 20 mL de solvente etanol/água (55:45, v/v) acidificado com 0.25% de ácido cítrico (até obtenção de pH = 3), num frasco de vidro com tampa. A extração seguiu condições estabelecidas de temperatura ($T=72$ °C) e tempo (60 minutos). Após o procedimento descrito, as amostras foram centrifugadas (Centurion K24OR, West Sussex, Reino Unido) a 5000 rpm durante 5 min a 10 °C. De seguida foram filtradas através de papel filtro (Whatman nº 4), para remoção de sólidos suspensos. O sobrenadante separado e com recurso a um evaporador rotativo (Büchi R-210, Flawil, Suíça), a fração etanólica foi eliminada a uma temperatura de 35 °C, de forma a não ocorrer degradação dos compostos. Por fim, a fração aquosa obtida foi congelada e liofilizada (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EUA), obtendo-se um extrato rico em compostos antociânicos. O extrato liofilizado (**Figura 25**) foi armazenado ao abrigo da luz para posterior análise.



Figura 25. Extrato rico em compostos antociânicos (após liofilização).

3.8. Avaliação do potencial corante do extrato rico em compostos antociânicos obtido nas condições ótimas a partir das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*

A avaliação do potencial corante do extrato foi efetuado através da medição da cor e pela medição dos compostos corantes por cromatografia, de forma a corroborar os dados fornecidos pelo MRS. A cor do extrato corante rico em compostos antociânicos foi medido através de um colorímetro (modelo CR-400, Konica Minolta Sensing Inc.) (Fernandes et al., 2018), seguindo o procedimento descrito anteriormente na *secção 3.3*. A quantificação dos compostos antociânicos foi efetuada por cromatografia utilizando um sistema de HPLC-DAD-ESI/MS tal como descrito na *secção 3.4.2.5.2.*

3.9. Avaliação das propriedades bioativas do extrato rico em compostos antociânicos obtido nas condições ótimas a partir das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*

3.9.1. Atividade antioxidante

A avaliação do potencial antioxidante do extrato rico em compostos antociânicos, obtido pelo processo de extração otimizado, foi realizada através de três ensaios *in vitro* (atividade captadora de radicais livres DPPH, poder redutor e inibição da descoloração do β -caroteno), de acordo com os procedimentos descritos nas *secções 3.5.2.1.*, *3.5.2.2.*, e *3.5.2.3.*, respetivamente.

3.9.2. *Atividade antimicrobiana*

A atividade antimicrobiana do extrato rico em compostos antociânicos, obtido pelo processo de extração otimizado, foi efetuada através da avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica, utilizando as estirpes de bactérias Gram-positivos, Gram-negativos e fungos, seguindo o procedimento previamente descrito nas *secções 3.5.3.1.* e *3.5.3.2.*, respetivamente.

3.9.3. *Atividade citotóxica e hepatotóxica*

Para a avaliação da atividade citotóxica do extrato rico em compostos antociânicos, obtido pelo processo de extração otimizado, foram realizados ensaios em linhas celulares tumorais e numa cultura de células primária não-tumoral, tal como descrito anteriormente na *secção 3.5.4.* e *3.5.5.*, respetivamente.

4. Resultados e Discussão

4.1. Avaliação da cor nas folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*

A cor é um fator muito importante na escolha de um produto natural, destacando-se as matrizes com cores mais acentuadas como as de maior interesse (Appelhagen et al., 2018). Os resultados da análise cromática no espaço de cor CIE $L^* a^* b^*$ das amostras de *O. basilicum* var. *purpurascens* (folhas frescas e pó seco) estão presentes na **Tabela 8**. A escala da luminosidade (L^*) varia entre 0 e 100 e a de a^* (do verde ao vermelho) e b^* (do azul ao amarelo) varia entre -120 e 120 (Xu et al., 2016). A cor das folhas frescas, para o parâmetro L^* revelaram em média um valor de $35,6 \pm 0,9$ e os parâmetros a^* e b^* mostraram valores de $7,6 \pm 0,1$ e $1,11 \pm 0,05$, respetivamente. Por outro lado, o parâmetro L^* do pó seco de manjerição vermelho rubi apresentou um valor de 31 ± 1 , enquanto que as variáveis a^* e b^* apresentaram valores de $5,3 \pm 0,3$ e $3,7 \pm 0,1$, respetivamente.

Tabela 8. Parâmetros físicos (cor - CIE $L^* a^* b^*$) de *O. basilicum* var. *purpurascens* (média \pm DP).

Parâmetros de avaliação da cor	Folhas frescas	Pó de folhas liofilizadas	<i>p-value</i>
L^*	36 ± 1	31 ± 1	<0,01
a^*	$7,6 \pm 0,1$	$5,3 \pm 0,2$	<0,01
b^*	$1,11 \pm 0,05$	$3,7 \pm 0,1$	<0,01

L^* - luminosidade; a^* eixo cromático de verde (-) a vermelho (+); b^* , eixo cromático de azul (-) a amarelo (+)

De acordo com estes resultados, foi evidente que o processo de desidratação das folhas por liofilização influencia a cor das amostras estudadas. A partir da avaliação do parâmetro L^* verificou-se que as folhas frescas possuem uma cor mais clara comparativamente com o pó das folhas liofilizadas. Por outro lado, o valor do parâmetro a^* foi maior nas folhas frescas relativamente ao pó das folhas liofilizadas, constatando que o primeiro apresentou um tom mais próximo de vermelho. Em relação ao parâmetro b^* , foi visível que as folhas frescas apresentaram tonalidade mais azul e as folhas liofilizadas tendem a ter uma cor menos azulada.

Com estes resultados, é possível constatar que o processo de liofilização diminuiu a cor púrpura, o que pode estar relacionado a uma leve degradação do conteúdo de antocianinas (Jiang et al., 2018).

Diversos estudos foram realizados com o objetivo de compreender a influência dos processos de desidratação na preservação da cor e, conseqüentemente na degradação de compostos corantes (e.g. antocianinas). Num trabalho realizado por Lima-Corrêa et al. (2017), foi avaliada a influência das condições de secagem (secagem por calor e liofilização) na cor das folhas frescas e secas de *O. basilicum* L.. Os resultados mostraram que os valores de L^* diminuíram após a secagem, indicando uma cor mais escura nas folhas secas de manjeriço comparativamente com as folhas frescas. No entanto o parâmetro a^* aumentou significativamente, indicando que a cor das folhas se tornou menos verde, e o parâmetro b^* não foi afetado pela temperatura, porém diminuiu quando a temperatura aumentou para 30 °C. Tendo em conta esses resultados e comparando os dois processos de desidratação, fica evidente que a secagem por calor exerce maior influência na perda de cor que a liofilização. Sendo que, a percentagem da redução de luminosidade (L^*) foi maior no processo de secagem a quente (26,9%) que no processo de liofilização (11,8 %); contudo, em ambos houve perda de cor nos parâmetros a^* e b^* , sendo mais evidente quando o processo de secagem por calor foi aplicado.

Os autores Luna-Vital et al. (2017), Buvé et al. (2018) e Jiang et al. (2018) demonstraram que a perda de cor em matrizes naturais, sob influência de fatores externos (pH e temperatura), está relacionada com a degradação das antocianinas, sendo a diminuição do teor total de antocianinas está diretamente proporcional à diminuição do valor a^* (azul para vermelho).

Assim, a fim de preservar as características originais das matrizes naturais coradas, nomeadamente folhas de plantas, deve ser aplicado o processo de secagem adequado, sendo que o processo de liofilização tem demonstrado ser a metodologia mais eficiente, com menor degradação associada (Lima-Corrêa et al., 2017).

4.2. Caracterização nutricional das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*

Os resultados da avaliação do valor nutricional das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens* estão presentes na **Tabela 9**. Tendo em conta os resultados obtidos, foi evidente que os macronutrientes presentes em maior quantidade foram os hidratos de carbono ($7,17 \pm 0,07$ g/100 g mf), seguido do teor em proteínas ($2,3 \pm 0,1$ g/100 g mf). A concentração em gordura foi consideravelmente baixa, apresentando um valor de 0,36

$\pm 0,02$ g/100 g mf. Em relação à humidade, esta planta apresentou um teor de 85 ± 2 g/100 g, revelando uma elevada percentagem de água na sua composição. Em geral, o nível de energia das folhas do *O. basilicum* var. *purpurascens* foi de $41,22 \pm 0,04$ kcal/100 g mf.

Tabela 9. Parâmetros nutricionais das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens* (média \pm DP).

Valor nutricional	Valor
Humidade (g/100 g mf)	85 ± 2
Cinzas (g/100 g mf)	$2,84 \pm 0,01$
Proteínas (g/100 g mf)	$2,3 \pm 0,1$
Gordura (g/100 g mf)	$0,36 \pm 0,02$
Hidratos de carbono (g/100 g mf)	$7,17 \pm 0,07$
Energia (kcal/100 g mf)	$41,22 \pm 0,04$

mf- massa fresca

El-Hadidy & Mostafa (2011), também estudaram o valor nutricional das folhas frescas de manjeriço vermelho rubi e os resultados foram concordantes com os apresentados neste trabalho. Os hidratos de carbono foram, também, os principais macronutrientes ($4,70 \pm 0,91$ %), seguidos das proteínas ($3,24 \pm 0,23$ %). O conteúdo em cinzas foi de $1,78 \pm 0,11$ % e a amostra apresentou um teor de humidade semelhante com um valor de $84,40 \pm 0,46$ %. Murillo-Amador et al., (2013) estudaram o perfil nutricional de vinte e quatro cultivares de *Ocimum* em dois ambientes de cultivo diferentes, incluindo o manjeriço vermelho rubi. Os resultados obtidos por estes autores divergiram dos resultados apresentados no presente estudo, revelando quantidades de proteína, cinzas e gordura de 16,36 %, 15,05 % e 2,14 %, respetivamente. O teor de humidade (83,44 %) foi semelhante ao obtido neste trabalho, no entanto, as folhas secas da amostra de manjeriço vermelho rubi revelaram um valor energético de 3951,64 cal/g. Pereira et al. (2015a) realizaram estudos a nível do valor nutricional de *O. basilicum* L. verde e os resultados vão ao encontro dos obtidos neste trabalho, quando convertidos para massa seca. Os macronutrientes principais foram os hidratos de carbono ($82,5 \pm 0,1$ g/100 g ms) apresentando um valor superior ao obtido neste trabalho ($63,5 \pm 0,5$ g/100 g ms), o teor em cinzas ($15,6 \pm 0,1$ g/100 g ms) foi ligeiramente inferior ao das folhas de manjeriço vermelho rubi ($18,73 \pm 0,04$ g/100 g ms). O manjeriço verde apresentou um teor em proteínas ($0,89 \pm 0,04$ g/100 g ms) inferior ao obtido neste trabalho e a gordura ($1,03$ g/100 g ms) foi ligeiramente inferior à do *O. basilicum* var.

purpurascens ($2,4 \pm 0,1$ g/100 g ms). As diferenças encontradas nos estudos citados, podem ser devidas às distintas condições de cultivo desta espécie vegetal o que reflete elevada influência na composição química das plantas.

4.3. Composição química das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*

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

Os resultados da composição química (açúcares livres, ácidos orgânicos, tocoferóis e ácidos gordos) das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens* está presente na **Tabela 10**.

Relativamente ao perfil em açúcares, as folhas do manjeriço vermelho rubi revelaram a presença de quatro açúcares, sendo dois monossacáridos (glucose e frutose) e dois dissacáridos (sacarose e trealose). A glucose foi o principal açúcar livre detetado ($0,040$ g/100 g mf), enquanto que a sacarose foi a molécula identificada em menor concentração ($0,010$ g/100 g mf). A frutose e a trealose foram encontradas em igual concentração ($0,020 \pm 0,002$ e $0,020 \pm 0,007$ g/100 g mf, respetivamente). O teor total de açúcares revelou, em geral, uma quantidade baixa ($0,090 \pm 0,003$ g/100 g mf). Na literatura não são encontrados estudos que avaliam a composição em açúcares desta variedade. No entanto, Pereira et al. (2015a) estudaram a composição química de *O. basilicum* L. verde e os resultados mostraram a presença das mesma moléculas: frutose, glucose, sacarose e trealose. Ao contrário do presente estudo, a sacarose foi o composto encontrado em maior concentração ($1,02 \pm 0,07$ g/100g ms), seguido da trealose ($0,85 \pm 0,05$ g/100 g ms), frutose ($0,52 \pm 0,01$ g/100 g ms) e glucose ($0,40 \pm 0,01$ g/100 g ms).

Por outro lado, num estudo realizado por Carcho et al. (2016), onde estudaram as folhas manjeriço como ingrediente funcional e conservante no queijo "Serra da Estrela", os resultados revelaram que o açúcar mais abundante nas decocções de *O. basilicum* verde foi a frutose (12 ± 1 mg/g de decocção), seguida de sacarose e glucose ($11,7 \pm 0,4$ e $5,8 \pm 0,6$ mg/g de decocção, respetivamente). Embora que estes resultados se refiram à mesma espécie, as diferenças observadas podem ser explicadas pelas diferentes variedades estudadas, bem como pelos métodos de extração utilizados.

Os ácidos orgânicos presente nestas folhas também foram caracterizados e os resultados revelaram a presença de sete moléculas: ácidos oxálico, quínico, málico, chiquímico, cítrico, fumárico e ascórbico (**Tabela 10**). O ácido quínico foi identificado

como o composto mais abundante ($7,4 \pm 0,4$ g/100 g mf), seguido do ácido oxálico ($5,37 \pm 0,05$ g/100 g mf), málico ($3,55 \pm 0,05$ g/100 g mf) e cítrico ($2,76 \pm 0,04$ g/100 g mf). Por outro lado, os ácidos chiquímico, fumárico e ascórbico revelaram concentrações mais baixas (0,0578; 0,027 e 0,023 g/100 g mf), e a concentração total de ácidos orgânicos foi de $19,2 \pm 0,3$ g/100 g mf.

Os ácidos orgânicos mais abundantes já foram descritos como tendo inúmeras funções bioativas, nomeadamente o ácido quínico tem demonstrado propriedades terapêuticas, entre as quais, a atividade radioprotetora, efeitos antidiabéticos, anti-neuroinflamatórios e antioxidantes (Jang et al., 2017). Por outro lado, o ácido oxálico é considerado um dos ácidos orgânicos mais fortes e abundantes na natureza, sendo estudado em diferentes áreas de investigação. Este ácido orgânico tem demonstrado diversas propriedades, nomeadamente potencial antioxidante, agente tóxico contra agentes patogénicos de abelhas e capacidade conservante, no que diz respeito ao retardamento da maturação de muitas frutas e vegetais (Kayashima & Katayama, 2002; Cefola & Pace, 2015; Nanetti et al., 2015). O ácido málico tem sido amplamente utilizado em diferentes sectores, tais como na indústria alimentar e de bebidas (usado como intensificador de sabor e acidulante), produtos químicos, farmacêuticos e também na agricultura. Além disso, estudos também descrevem a sua aplicação na limpeza de metais, acabamento têxtil, tratamento de água e síntese química de ácido poli β -L-málico (aplicado como plástico biodegradável) (Cheng et al., 2017; Dai et al., 2018). Em relação ao ácido cítrico, vários estudos revelam o seu forte potencial antimicrobiano, bem como o seu uso no tratamento de infeções por queimaduras (Osaili et al., 2015; Nagoba et al., 2017). Contudo, esta molécula é também utilizada na preparação de citratos medicinais, confeitaria, refrigerantes e sais efervescentes (Angumeenal & Venkappayya, 2013).

O perfil de ácidos orgânicos do extrato obtido por decocções de *O. basilicum* verde foi previamente descrito (Carocho et al., 2016), revelando a presença de ácidos oxálico, quínico, málico, chiquímico e cítrico. Também neste estudo o principal ácido orgânico foi o ácido quínico (180 ± 5 mg/g de decocção liofilizada), seguido dos ácidos oxálico, málico, cítrico e chiquímico (98 ± 4 ; 54 ± 3 ; 38 ± 1 e $2,92 \pm 0,03$ mg/g de decocção, respetivamente), sendo a ordem de abundância dos compostos de acordo com a ordem descrita no presente estudo.

Relativamente à variedade manjeriço vermelho rubi, tendo em conta a literatura, não foram encontrados estudos anteriores sobre a composição de ácidos orgânicos.

Tendo em conta a avaliação do perfil em tocoferóis, os resultados obtidos estão presentes na **Tabela 10**. As isoformas α -, β -, γ - e δ -tocoferol, foram detetadas nas folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*, destacando-se o γ -tocoferol como a molécula mais abundante ($34,6 \pm 0,7$ mg/100 g mf), seguida por α - tocoferol, β - e δ -tocoferóis, que evidenciaram uma concentração total de $39,3 \pm 0,8$ mg/100 g mf.

Todas as isoformas dos tocoferóis (α -, β -, γ - e δ -) são sintetizadas e armazenadas nas folhas e nas sementes das plantas, exercendo funções antioxidantes (Azzi, 2017). Estas moléculas têm recebido elevada atenção por parte dos diferentes sectores industriais, tal como, no sector alimentar, cosmético e farmacêutico. Na indústria alimentar, este vitâmero é usado para aumentar o prazo de validade e a estabilidade dos alimentos. Terapeuticamente, estudos têm revelado propriedades fotoprotetoras, antioxidantes, hipolipemiantes, antiaterogénicas, anti-hipertensivas, atividades nefroprotetoras e anti-inflamatórias (Saini & Keum, 2016). Em particular, o γ -tocoferol destaca-se como um forte antioxidante e revela efeitos anti-inflamatórios, anti-proliferativos e pró-apoptóticos (Reiter et al., 2007; Das Gupta e Suh, 2016).

Gómez-Coronado et al. (2004), estudaram o conteúdo de tocoferóis em produtos comestíveis de origem vegetal, revelando a presença de α -tocoferol (4,05 mg/100 g de folhas frescas) e γ -tocoferol (0,69 mg/100 g de folhas frescas) na espécie *O. basilicum* verde. Estes valores demonstram que a variedade de manjeriço aqui estudada, possui maior conteúdo em tocoferóis (α - e γ - isoformas). No entanto, na literatura não foram encontrados estudos que descrevam a composição destas vitaminas nesta variedade.

A composição em ácidos gordos também foi avaliada, estando os resultados presentes na **Tabela 10**. Vinte moléculas de ácidos gordos foram identificadas nas folhas secas de *O. basilicum* var. *purpurascens*, surgindo o ácido α -linolénico (C18:3n3) em maior percentagem ($53,79 \pm 0,04\%$). Em concentrações significativas foram identificadas as moléculas de ácido palmítico (C16:0; $16,75 \pm 0,07\%$), linoleico (C18:2n6; $6,61 \pm 0,01\%$) e oleico (C18:1n9; $5,20 \pm 0,02\%$). Os demais ácidos gordos identificados apresentaram concentrações reduzidas, particularmente, inferiores a 5 %.

Segundo alguns autores, o ácido α -linolénico pode ser obtido através da ingestão regular de alguns alimentos, como óleos de sementes, feijões, nozes e vegetais folhosos, e tem sido descrito como tendo propriedades benéficas para a saúde, demonstrando propriedades terapêuticas, tais como: efeitos protetores ao nível do sistema cardiovascular, efeitos anticancerígenos, anti-osteoporóticos, anti-inflamatórios,

hipocolesterolémicos, atividade antiarrítmica, atividade antioxidante e diminuição do risco de demência leve (Kim et al., 2014).

Os ácidos gordos polinsaturados (PUFA; $60,88 \pm 0,05$ %) foram o principal grupo de ácidos gordos presentes na amostra, seguidos dos ácidos gordos saturados (SFA; $32,88 \pm 0,08$ %) e dos ácidos gordos monoinsaturados (MUFA; $6,24 \pm 0,03$ %).

Estes resultados estão de acordo com um estudo realizado por Kadan et al. (2016), onde foi avaliada a composição química do extrato metanólico de *O. basilicum* verde. Os resultados também evidenciaram os ácidos α -linolénico, palmítico e linoleico, como os principais compostos, exibindo concentrações de 4,39; 4,26 e 1,38 %, respetivamente.

Pereira et al. (2015a) também estudaram uma variedade verde de *O. basilicum*, e na avaliação dos ácidos gordos também identificaram PUFA como o grupo maioritário, seguido pelos SFA e finalmente pelos MUFA, revelando maiores concentrações de ácido α -linolénico ($55,89 \pm 0,26$ %), ácido linoleico ($9,84 \pm 0,03$ %) e ácido palmítico ($17,79 \pm 0,31$ %).

Os ácidos gordos polinsaturados são moléculas essenciais para a saúde humana, tendo um papel importante nas funções da barreira hematoencefálica, fluidez da membrana neural, neurogênese, memória, emoções e no desenvolvimento e manutenção da estrutura cerebral durante o estágio embrionário e adulto (Khan & He, 2017, Yang et al., 2018). Além disso, desempenham um papel significativo na regulação do sistema endocanabinoide, que é o principal regulador do humor e das emoções (Khan & He, 2017). Estudos relatam que o consumo insuficiente de ácidos gordos polinsaturados aumenta a probabilidade de doenças relacionadas à idade, tais como doenças cardiovasculares, cerebrais, inflamatórias e cancro (Kraic et al., 2018). Uma vez mais, para a variedade avaliada no presente estudo, não foram encontrados estudos sobre a sua composição em ácidos gordos.

Tabela 10. Composição em açúcares, ácidos orgânicos, tocoferóis e ácidos gordos das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens* (média \pm DP).

Teor em açúcares (g/100 g mf)		Ácidos gordos (%)	
Frutose	0,020 \pm 0,002	C6:0	0,029 \pm 0,001
Glucose	0,040 \pm 0,002	C10:0	0,175 \pm 0,005
Sacarose	0,010 \pm 0,004	C12:0	0,114 \pm 0,005
Trealose	0,02 \pm 0,01	C13:0	4,32 \pm 0,04
Total	0,100 \pm 0,001	C14:0	0,462 \pm 0,004
Teor em ácidos orgânicos (g/100 g mf)		C15:0	0,69 \pm 0,02
Ácido oxálico	5,37 \pm 0,05	C16:0	16,75 \pm 0,07
Ácido quínico	7,4 \pm 0,4	C16:1	1,044 \pm 0,003
Ácido málico	3,55 \pm 0,05	C17:0	0,41 \pm 0,01
Ácido chiquímico	0,0578 \pm 0,0003	C18:0	4,167 \pm 0,001
Ácido cítrico	2,76 \pm 0,04	C18:1n9	5,20 \pm 0,02
Ácido fumárico	0,027 \pm 0,001	C18:2n6	6,61 \pm 0,01
Ácido ascórbico	0,023 \pm 0,001	C18:3n3	53,78 \pm 0,02
Total	19,2 \pm 0,3	C20:0	3,436 \pm 0,005
Tocoferóis (mg/100 g mf)		C20:2	0,189 \pm 0,002
α -Tocoferol	4,1 \pm 0,1	C20:3n3	0,295 \pm 0,004
β -Tocoferol	0,38 \pm 0,02	C21:0	0,40 \pm 0,01
γ -Tocoferol	35 \pm 1	C22:0	1,23 \pm 0,03
δ -Tocoferol	0,26 \pm 0,03	C23:0	0,26 \pm 0,01
Total	39 \pm 1	C24:0	0,44 \pm 0,02
		SFA	32,9 \pm 0,1
		MUFA	6,24 \pm 0,03
		PUFA	60,87 \pm 0,04

Ácido capríco (C6:0); Ácido cáprico (C10:0); Ácido láurico (C12:0); Ácido tridecílico (C13:0); Ácido mirístico (C14:0); Ácido pentadecanóico (C15:0); Ácido palmítico (C16:0); Ácido palmitoleico (C16:1); Ácido heptadecanóico (C17:0); Ácido esteárico (C18:0); Ácido oleico (C18:1n9); Ácido linoleico (C18:2n6c); Ácido α -linolénico (C18:3n3); Ácido araquídico (C20:0); Ácido eicosadienoico (C20:2); Ácido eicosatrienoico (C20:3n3); Ácido heneicosílico (C21:0); Ácido beénico (C22:0); Ácido tricosanóico (C23:0); Ácido lignocérico (C24:0). SFA – Ácidos gordos saturados; MUFA- Ácidos gordos monoinsaturados; PUFA - Ácidos gordos polinsaturados.

4.3.2. Perfil em compostos fenólicos não antociânicos e antociânicos

O perfil detalhado dos compostos fenólicos presentes nas amostras de manjeriço vermelho rubi está representado na **Tabela 11**. A tentativa de identificação dos compostos teve por base tempos de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima na região de UV-Vis (λ_{\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 vinte e seis compostos (**Figura 26**), treze moléculas não antociânicos e treze antociânicos. Dentro dos compostos não-antociânicos foram identificados três ácidos fenólicos, nove derivados de flavanonas (derivados de eridictiol e de naringenina) e um flavanonol. No que diz respeito aos compostos antociânicos, foram identificados doze derivados glicosilados de cianidina, sendo estes os principais

compostos presentes, no entanto, foi identificado um composto derivado de pelargonidina.

Em relação aos derivados de flavonoides não antociânicos, os compostos 2, 3 e 6 ($[M-H]^-$ a m/z 449), 5 ($[M-H]^-$ a m/z 463) e 9 e 12 ($[M-H]^-$ a m/z 535) foram identificados como glicósidos de eriodictiol com base nos seus espectros UV (λ_{\max} cerca de 285 nm com um ressalto a 330 nm) e a produção do fragmento MS^2 a m/z 287. Os picos 2, 4 e 6 foram identificados como isómeros de eriodictiol-*O*-hexósido, em que o fragmento MS^2 revelou a perda de uma unidade de hexosil (m/z a 287; -162 u). A posição e a natureza da porção do hexósido não pude ser identificada, porque os tempos de retenção dos compostos não correspondiam a nenhum dos padrões disponíveis. De igual modo, o pico 5 apresentou um fragmento MS^2 a m/z 287, tendo uma perda de uma unidade de glucurónido (-176 u), tendo sido tentativamente identificada como eriodictiol-*O*-glucurónido. Os compostos 9 e 12 apresentaram um íon pseudomolecular com 86 u (fração malonil) maior que os compostos 2, 4 e 6, sendo ambos os picos identificados como eriodictiol-*O*-malonil-hexósido. De modo semelhante, os picos 7, 8 e 13 foram identificados como glicósidos de naringenina (λ_{\max} por volta de 353 nm e com um fragmento MS^2 a m/z 271), e o pico 1 como glicósido de taxifolina (λ_{\max} por volta de 350 nm e com um fragmento MS^2 a m/z 303). Enquanto que o pico 1 ($[M-H]^-$ a m/z 465) e 7 ($[M-H]^-$ a m/z 433) foram tentativamente identificados como taxifolina-*O*-hexósido e naringenina-*O*-hexósido, respetivamente, o composto 13 ($[M-H]^-$ a m/z 519) foi tentativamente identificado como naringenina-*O*-malonil-hexósido. O composto 8 ($[M-H]^-$ a m/z 565) apresentou os seguintes iões de fragmentação 445 ($[M-H-120]^-$), 313 ($[M-H-120-132]^-$) e 271 ($[M-H-294]^-$), podendo ser identificado como naringenina-*C*-hexosil-*O*-acetil-pentoside. No entanto, nenhum composto com tais características foi descrito na literatura, portanto, este composto foi simplesmente identificado como um derivado de naringenina. Não existem estudos anteriores que mencionem a presença destes compostos flavonoides não antociânicos nas folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*.

No que diz respeito aos ácidos fenólicos, o composto 10 foi identificado positivamente como ácido rosmarínico, tendo por base a comparação do tempo de retenção, espectros de UV-Vis e padrão de fragmentação MS, com o padrão comercial. O composto 11 revelou características semelhantes ao pico 10 sendo identificado como um isómero do ácido rosmarínico. O composto 3 ($[M-H]^-$ a m/z 473) apresentou um

padrão de fragmentação que permitiu identificar este composto como ácido chicórico. Os compostos 3 (ácido chicórico) e 10 (ácido rosmarínico) têm sido amplamente identificados em amostras de manjeriço, sendo o ácido rosmarínico um dos principais compostos fenólicos não antocianínicos presentes no manjeriço vermelho rubi (Kwee & Niemeyer, 2011, Srivastava et al., 2014; Srivastava et al., 2016; Flanigan and Niemeyer, 2014; Luna et al., 2015; Moghaddam & Mehdizadeh, 2015).

Os compostos antocianínicos identificados representam 19% dos compostos fenólicos totais. Os compostos 16-23 e 25-26 foram identificados em estudos prévios descritos na literatura por Luna et al. (2015) e Phippen e Simon (1998) e por conseguinte foram identificados de igual forma nesta amostra, pois apresentaram o mesmo íon molecular, padrão de fragmentação e espectros UV-Vis.

Os compostos 14 e 15 ($[M-H]^-$ a m/z 919) apresentaram um íon pseudomolecular com menos -162 u (resíduo hexósilo) em comparação com o pico 18 e 21 ($[M-H]^-$ a m/z 1081), tendo sido tentativamente identificados como isómeros 1 e 2 de cianidina-3-(*p*-cumaroil-6'-cafeoil)soforoside. O pico 24 ($[M-H]^-$ a m/z 1049) apresentou um padrão de fragmentação semelhante ao pico 22, porém com uma aglicona diferente (derivado de pelargonidina), sendo tentativamente identificado como pelargonidina-3-(6,6'-di-*p*-cumaroil)soforoside-5-glucósido. Entre as treze antocianinas identificadas, cianidina-3-(6,6'-di-*p*-cumaroil)soforoside-5-glucósido foi o principal composto antocianínico, quantificado nas folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*, seguido pelo isómero 1 de cianidina-3-(6-*p*-cumaroil-6'-Cafeoil)soforoside-5-glucósido.

Phippen & Simon, (1995) quantificaram catorze compostos antocianínicos em variedades de manjeriço roxo, entre as quais manjeriço vermelho rubi, sendo o conteúdo total de antocianinas de $17,44 \pm 0,80$ mg/100 g de massa fresca. Estes resultados não poderão ser comparados com os deste estudo, pois os resultados estão expressos em unidades distintas.

Tabela 11. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima na região de UV-Vis (λ_{\max}), tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos no extrato hidroetanólico de *O. basilicum* var. *purpurascens* (média \pm DP).

Pico	Tr (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁺	Fragmento principal ESI- MSn [intensidade (%)]	Tentativa de identificação	Quantificação (mg/g)
1	6,7	287,sh320	465	303(100)	Taxifolina- <i>O</i> -hexósido ^a	1,52 \pm 0,02
2	10,9	285,sh330	449	287(100)	Eriodictiol- <i>O</i> -hexósido isômero 1 ^b	1,6 \pm 0,1
3	12,4	287, sh330	449	287(100)	Eriodictiol- <i>O</i> -hexósido isômero 2 ^b	3,6 \pm 0,1
4	14,1	325	473	311(98),293(100)	Ácido chicórico ^c	3,3 \pm 0,1
5	15,2	285,sh325	463	287(100)	Eriodictiol- <i>O</i> -glucurônido ^b	1,48 \pm 0,02
6	16,0	285, sh330	449	287(100)	Eriodictiol- <i>O</i> -hexósido isômero 3 ^b	12,7 \pm 0,4
7	16,5	284, sh320	433	271(100)	Naringenina- <i>O</i> -hexósido ^b	4,7 \pm 0,2
8	19,7	287, sh320	565	445(100),313(17),271(48)	Derivado de naringenina ^b	1,6 \pm 0,1
9	20,6	285,sh335	535	491(100),287(10)	Eriodictiol- <i>O</i> -malonil-hexósido isômero 1 ^b	20,4 \pm 0,4
10	21,9	327	359	197(28),179(42),161(100),133(5)	Ácido rosmarínico ^d	95 \pm 1
11	23,0	323	359	197(26),179(35),161(100),133(6)	Ácido rosmarínico isômero ^d	9,6 \pm 0,4
12	24,5	290,sh330	535	491(60),287(100)	Eriodictiol- <i>O</i> -malonil-hexósido isômero 2 ^b	2,67 \pm 0,03
13	25,8	284,sh330	519	475(100),271(12)	Naringenina- <i>O</i> -malonil-hexósido ^b	14,69 \pm 0,01
TAF						108 \pm 2
TFNA						68 \pm 1
TCFNA						173 \pm 3
Pico	Tr (min)	λ_{\max} (nm)	[M+H] ⁺	Fragmento principal ESI- MSn [intensidade (%)]	Tentativa de identificação	Quantificação (mg/g)
14	26,7	520	919	757(49),449(6),287(13)	Cianidina-3-(pC-6'-Caf)Sph isômero 1 ^e	4,66 \pm 0,07
15	30,6	520	919	757(49),449(6),287(13)	Cianidina-3-(pC-6'-Caf)Sph isômero 2 ^e	2,12 \pm 0,02
16	31,9	522	1005	757(6),535(11),287(11)	Cianidina-3-(6-pC)Sph-5-(6-Mal)Glc ^e	2,145 \pm 0,002
17	35,9	522	757	595(100),449(11),287(61)	Cianidina-3-(6pC)Glc-5-Glc ^e	1,95 \pm 0,01
18	37,4	530	1081	919(15),449(6),287(6)	Cianidina-3-(6-pC-6'-Caf)Sph-5-Glc isômero 1 ^e	5,41 \pm 0,05
19	38,2	532	1167	919(44),757(5),287(20)	Cianidina-3-(6-pC-6'-Caf)Sph-5-(6-Mal)Glc isômero 1 ^e	2,201 \pm 0,002
20	39,4	530	1167	919(27),757(5),287(6)	Cianidina-3-(6-pC-6'-Caf)Sph-5-(6-Mal)Glc isômero 2 ^e	1,98 \pm 0,01
21	39,9	530	1081	919(100),449(11),287(20)	Cianidina-3-(6-pC-6'-Caf)Sph-5-Glc isômero 2 ^e	2,14 \pm 0,02
22	40,5	530	1065	903(20),449(5),287(3)	Cianidina-3-(6,6'-dipC)Sph-5-Glc ^e	7,5 \pm 0,2
23	41,2	526	1151	989(10),903(5),287(5)	Cianidina-3-(6,6'-dipC)Sph-5-(6-Mal)Glc ^e	3,1 \pm 0,1
24	41,9	514	1049	887(33),433(9),271(5)	Pelargonidina-3-(6,6'-dipC)Sph-5-Glc ^f	3,03 \pm 0,01
25	42,4	526	1167	1005(63),919(23),449(8),287(13)	Cianidina-3-(6-pC-X-Mal-6'-Caf)Sph-5-Glc ^e	2,19 \pm 0,01
26	42,8	530	1151	989(28),449(17),287(5)	Cianidina-3-(6-pC-X-Mal-6'-pC)Sph-5-Glc ^e	2,381 \pm 0,002
TCA						40,8 \pm 0,4

Tr – tempo de retenção; TAF – total de ácidos fenólicos; TFNA – total de flavonoides não-antocianínicos; TCFNA – total de compostos fenólicos não-antocianínicos; TCA – total de compostos antocianínicos. pC – *p*-cumaroil; Sph – soforósido; Caf – cafeoil; Mal – malonil; Glc – glucósido. Curvas de calibração usadas: a- taxifolina ($y = 203766x - 208383$; $R^2 = 1$); b- naringenina ($y = 18433x + 78903$; $R^2 = 0.999$); c- ácido cafeico ($y = 388345x + 406369$; $R^2 = 0.994$); d- ácido rosmarínico ($y = 191291x - 652903$; $R^2 = 0.999$); e- cianidina-3-*O*-glucósido ($y = 97787x - 743469$; $R^2 = 0.999$); f- pelargonidina-3-*O*-glucósido ($y = 43781x - 275315$; $R^2 = 0.999$).

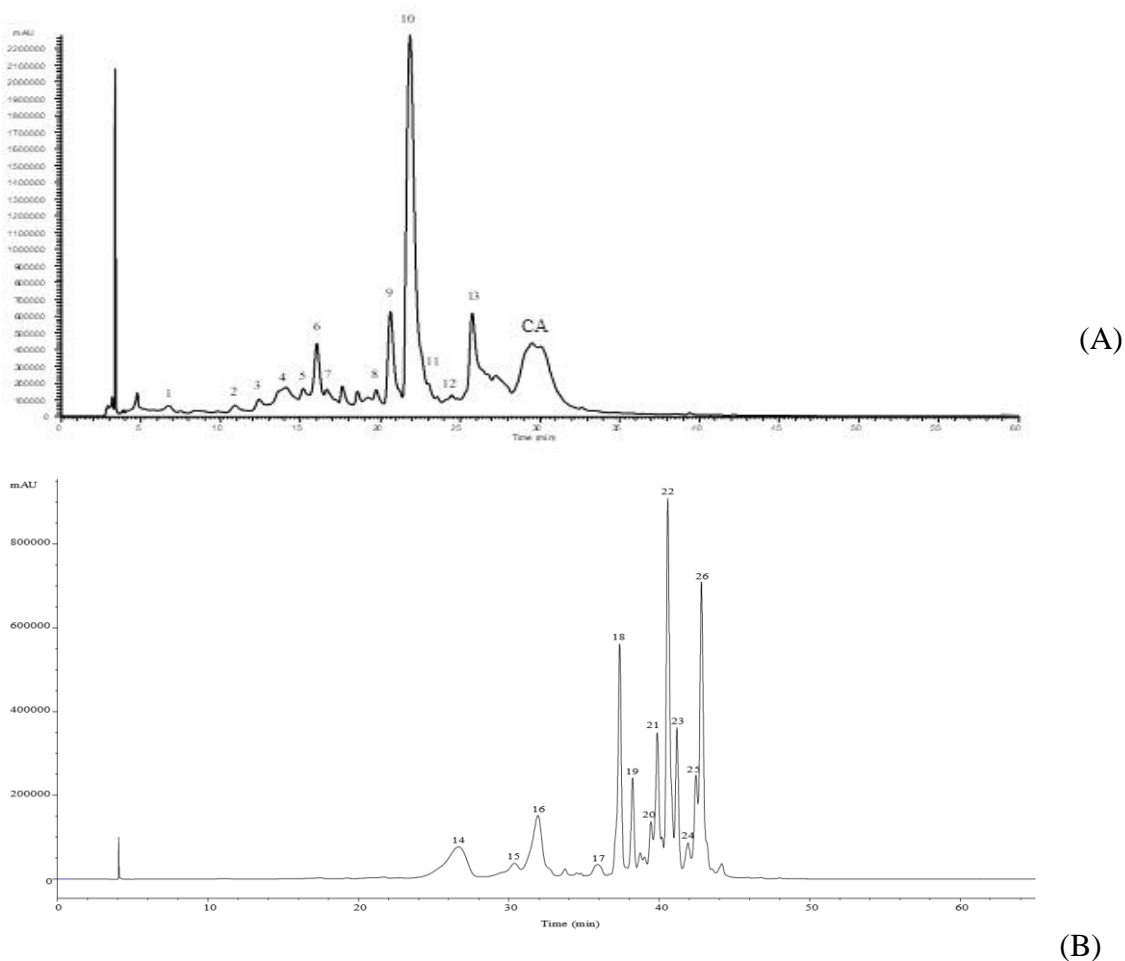


Figura 26. Perfil de compostos fenólicos de extratos hidroetanólicos de *O. basilicum* var. *purpurascens* registrados a 280 nm (A) e 520 nm (B).

A correspondência da numeração de picos é apresentada na Tabela 3 (CA - compostos antociânicos - não quantificados usando esta metodologia).

4.4. Atividade antioxidante, antimicrobiana, citotóxica e hepatotóxica do extrato hidroetanólico obtido a partir das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*

Para avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroetanólico do manjeriço vermelho rubi, foram utilizados três ensaios *in vitro* (atividade captadora do radical DPPH, poder redutor, inibição da descoloração do β -caroteno), estando os resultados patentes na **Tabela 12**. 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 revelada) foram obtidos no ensaio da atividade captadora de radicais DPPH ($57 \pm 2 \mu\text{g/mL}$), seguido do ensaio do poder redutor ($68,1 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$) e, por fim, do ensaio da inibição da descoloração do β -caroteno ($93 \pm 9 \mu\text{g/mL}$).

El-Hadidy & Mostafa, 2011, avaliaram atividade antioxidante das folhas secas de manjeriço vermelho rubi, através do ensaio do poder redutor. Os resultados mostraram que a amostra apresentou maior poder redutor, com um valor de $1,0 \pm 0,2$ mg/mL, comparativamente ao ácido ascórbico e ao ácido tânico, provando a existência de potencial antioxidante nesta variedade, tal como aconteceu no presente estudo. Flanigan & Niemeyer (2014), avaliaram também a atividade antioxidante de um extrato metanólico acidificado (HCl 0,2M) de folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*, através do ensaio do poder redutor, obtendo também resultados promissores. Contudo esses resultados não são comparáveis com os do presente estudo pois são apresentados em unidades diferentes.

Srivastava et al. (2014) também desenvolveram estudos a fim de determinar o potencial antioxidante em extratos hidroetanólicos (60/40 v/v) de material vegetal liofilizado (partes aéreas e raízes) de variedades de *O. basilicum*. Para tal recorreram a um ensaio de quimiluminescência e verificaram que o manjeriço vermelho rubi é uma das variedades que apresenta sinais de quimiluminescência mais elevados, logo tem maior atividade antioxidante, comparativamente às outras variedades estudadas. Estes autores associam esta atividade antioxidante à concentração de ácido rosmarínico da amostra, o que também pode servir como justificação no presente estudo, uma vez que a variedade de manjeriço estudada evidenciou elevada concentração neste ácido fenólico (95 ± 1 mg/g extrato).

Tabela 12. Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de *O. basilicum* var. *purpurascens*.

	Concentração	Trolox
Atividade antioxidante (valores EC₅₀, µg/mL)		
Atividade captadora do radical DPPH	57 ± 2	41 ± 1
Poder Redutor	$68,1 \pm 0,3$	$41,7 \pm 0,3$
Inibição do branqueamento de β -caroteno	93 ± 9	18 ± 1

*EC₅₀: Concentração de extrato correspondendo a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 da absorvância no ensaio do poder redutor. Trolox (controlo positivo). Valores EC₅₀: 42 µg/mL (atividade captadora de radicais DPPH), 41 µg/mL (poder redutor), e 18 µg/mL (inibição da descoloração do β -caroteno).

Na **Tabela 13**, estão apresentados os resultados obtidos na atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*. Este extrato foi testado contra um painel de bactérias patogénicas (bactérias Gram-positivos e Gram-negativos) e fungos. Os resultados evidenciaram capacidade

antimicrobiana frente às culturas bacterianas estudadas, destacando-se as concentrações obtidas para a estirpe *Bacillus cereus*, onde os valores CMI (0,10 mg/mL) e CMB (0,15 mg/mL) foram menores, ou seja, elevado potencial bactericida e bacteriostático do extrato frente a esta estirpe. Para além disso, o extrato também revelou uma alta atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae*, exibindo valores de CMI e CMB de 0,15 e 0,30 mg/mL, respetivamente.

Na avaliação do potencial antifúngico do extrato hidroetanólico revelou resultados promissores frente às leveduras testadas, com efeito fungicida em todos os casos. *Aspergillus ochraceus* foi a espécie mais suscetível ao extrato com valores de CMI e CMF de 0,037 mg/mL e 0,075 mg/mL, respetivamente. O mesmo efeito fungicida foi obtido na estirpe *Aspergillus fumigatus* (CMF = 0,075 mg/mL).

Quando se comparam os resultados obtidos pelo extrato de manjeriço vermelho rubi com os resultados dos controlos positivos, na maioria das bactérias e fungos testados, os valores de CMI e CMB/CMF foram muito menores, representando uma maior atividade antimicrobiana do extrato em comparação com os controlos.

Não havendo estudos sobre a atividade antimicrobiana de extratos hidroetanólicos das folhas do manjeriço vermelho rubi, foram considerados outros estudos sobre o poder antimicrobiano da espécie, particularmente em óleos essenciais. Assim, Baldim et al. (2018) estudaram os efeitos dos óleos essenciais de duas cultivares de manjeriço, entre as quais *O. basilicum* var. *purpurascens*, frente a bactérias Gram-positivos (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) e Gram-negativos (*Salmonella* sp. e *Pseudomonas aeruginosa*), ficando claro o seu potencial bactericida. Também, Carochi et al. (2016) estudaram a atividade antimicrobiana de decocções de manjeriço verde e os resultados foram positivos em relação à atividade antibacteriana e antifúngica. Também neste estudo *Bacillus cereus* foi a estirpe bacteriana mais sensível ao extrato, revelando valores de CMI de 0,125 mg/mL e CMB de 0,250 mg/mL, enquanto que *Penicillium ochlochloron* foi o fungo mais sensível (valor de CMI de 0,062 mg/mL e CMF de 0,125 mg/mL para extrato aquoso de manjeriço).

Tabela 13. Atividade antibacteriana (CMI e CMB mg/mL) e antifúngica (CMI e CMF mg/mL) do extrato hidroetanólico de *O. basilicum* var. *purpurascens*.

		Atividade Antibacteriana					
		<i>B.c.</i>	<i>S.a.</i>	<i>L.m.</i>	<i>E.c.</i>	<i>En.cl.</i>	<i>S.t.</i>
Extrato hidroetanólico	CMI	0,10	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
	CMB	0,15	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Estreptomicina	CMI	0,10	0,04	0,20	0,20	0,20	0,20
	CMB	0,20	0,10	0,30	0,30	0,30	0,30
Ampicilina	CMI	0,25	0,25	0,40	0,40	0,25	0,75
	CMB	0,40	0,45	0,50	0,50	0,50	1,20
		Atividade Antifúngica					
		<i>A.fun.</i>	<i>A.o.</i>	<i>A.n.</i>	<i>P.f.</i>	<i>P.o.</i>	<i>P.v.c.</i>
Extrato hidroetanólico	CMI	0,05	0,037	0,075	0,075	0,10	0,10
	CMF	0,075	0,075	0,15	0,15	0,15	0,15
Cetoconazol	CMI	0,25	0,20	0,20	0,20	2,50	0,20
	CMF	0,50	0,50	0,50	0,50	3,50	0,30
Bifonazol	CMI	0,15	0,10	0,15	0,20	0,20	0,10
	CMF	0,20	0,20	0,20	0,25	0,25	0,20

B.c.: *Bacillus cereus*; *S.a.*: *Staphylococcus aureus*; *L.m.*: *Listeria monocytogenes*; *E.c.*: *Escherichia coli*; *En. cl.*: *Enterobacter cloacae*; *S.t.*: *Salmonella typhimurium*; *A.fun.*: *Aspergillus fumigatus*; *A.o.*: *Aspergillus ochraceus*; *A.n.*: *Aspergillus niger*; *P.f.*: *Penicillium funiculosum*; *P.o.*: *Penicillium ochrochloron*; *P.v.c.*: *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*.

Os extratos hidroetanólicos têm uma concentração elevada em compostos fenólicos, os quais foram descritos como tendo alta atividade antimicrobiana (Steiner et al., 2017). A presença de ácido rosmarínico, como o principal composto fenólico, provavelmente, pode explicar a atividade antimicrobiana do manjeriço vermelho rubi. Estudos anteriores relataram várias propriedades biológicas deste ácido fenólico, nomeadamente atividade antibacteriana (Ge et al., 2018; Matejczyk et al., 2018). Estas qualidades despertam o interesse por esta molécula, bem como pelo manjeriço vermelho rubi, sendo uma fonte natural destes compostos bioativos.

Na literatura não foram encontrados estudos sobre a atividade antimicrobiana de folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*, tornando este estudo pioneiro nessa avaliação.

Relativamente aos resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade e hepatotoxicidade (**Tabela 14**), foi evidente que este extrato hidroetanólico (80:20 v/v), obtido a partir das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*, não apresentou capacidade anti-proliferativa nas linhas tumorais testadas, apresentando valores de $GI_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$. No entanto, aquando da avaliação da hepatotoxicidade utilizando uma cultura de células primárias não-tumorais (PLP2), os resultados demonstraram que o extrato não

demonstrou toxicidade contra a PLP2 na máxima concentração testada ($GI_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$).

Na literatura não foram encontrados estudos sobre o potencial citotóxico e hepatotoxicidade de folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*. Contudo, Carochio et al. (2016) avaliaram a atividade anti-proliferativa e hepatotoxicidade de decocções de *O. basilicum* verde, nas mesmas linhas celulares utilizadas neste estudo, e os resultados obtidos por estes autores evidenciaram, também, a ausência de potencial citotóxico em algumas linhas tumorais testadas (linhas celulares do carcinoma mamário e do carcinoma pulmonar), e inibição anti-proliferativa nas células do carcinoma cervical e do carcinoma hepatocelular ($GI_{50} 254 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ e $225 \pm 5 \mu\text{g/mL}$, respetivamente).

Tabela 14. Atividade citotóxica e hepatotóxica do extrato hidroetanólico de *O. basilicum* var. *purpurascens*.

	Concentração
Linhas celulares tumorais (valores GI_{50}, $\mu\text{g/mL}$)	
MCF-7 (carcinoma mamário)	>400
NCI-H460 (carcinoma pulmonar)	>400
HeLa (carcinoma cervical)	>400
HepG2 (carcinoma hepatocelular)	>400
Células não tumorais (valores GI_{50}, mg/mL)	
PLP2	>400

GI_{50} – concentração que inibiu 50% do crescimento celular. Valores GI_{50} de Elipticina (controlo positivo): $1,21 \mu\text{g/mL}$ (MCF-7), $1,03 \mu\text{g/mL}$ (NCI-H460), $0,91 \mu\text{g/mL}$ (HeLa), $1,10 \mu\text{g/mL}$ (HepG2) e $2,29 \mu\text{g/mL}$ (PLP2). $GI_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$ - não tem atividade.

4.5. Otimização do processo de obtenção de um extrato corante à base de antocianinas a partir das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*

4.5.1. Critérios de resposta para a análise de MSR

De forma a otimizar o processo de extração das antocianinas das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens* foi aplicada a metodologia de superfície de resposta (MSR), que avalia o efeito de múltiplas variáveis, bem como as suas interações, resultando em uma ou mais respostas.

Com a finalidade de obter uma otimização das condições de extração de antocianinas, o desenho experimental DCCC de MSR, associado a 5 níveis para as 3 variáveis

independentes, foi aplicado segundo as seguintes variáveis e respectivos intervalos: t (20-120 min), T (25-85 °C) e S (0-100%).

Uma descrição detalhada dos valores naturais e codificados das variáveis selecionadas para as 28 combinações de respostas, avaliadas através do *DCCC*, estão apresentadas na **Tabela 15**. A **Figura 27** ilustra um resumo abrangente das diversas etapas usadas para o procedimento de otimização, a fim de recuperar os compostos antociânicos das folhas de manjeriço vermelho rubi. De outro modo, a representação do cromatograma que explicita a análise do perfil em antocianinas do extrato hidroetanólico das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens* através de um sistema HPLC-DAD-ESI/MS obtido através do ensaio experimental (**Tabela 15**), está de acordo com o perfil descrito anteriormente na **seção 4.3.2**. (**Figura 26B**), onde também foram identificadas treze compostos antociânicos (**Tabela 11**) com base nos cromatogramas UV-vis e espectros de MS.

Os conteúdos individuais (*P1* a *P13*) e agrupados (*TCA*) foram utilizados como critérios de resposta para otimizar as condições da HAE das folhas de manjeriço vermelho rubi, utilizando MSR. Também foram considerados os valores do rendimento de extração, que variaram de 13,22 a 41,00 % com os ensaios experimentais nº 16 e 21, respectivamente (**Tabela 15**). Deste modo, um total de 15 variáveis de resposta foram determinadas e usadas como critérios de otimização.

Tabela 15. Delineamento experimental (variáveis independentes e os seus valores codificados e naturais), valores para compostos antociânicos (mg/g E) e rendimento de extração (%) obtidos nas 28 execuções envolvidas na otimização da extração de HAE por MSR.

Projeto experimental DCCC de cinco níveis

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
Valores codificados	X_1 : Tempo (t)	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1,68	-1,68	0	0	0	0	-1,68	-1,68	-1,68	-1,68	1,68	1,68	1,68	1,68	0	0	0	0	0	0	
	X_2 : Temp. (T)	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	0	0	-1,68	1,68	0	0	-1,68	-1,68	1,68	1,68	-1,68	-1,68	1,68	1,68	0	0	0	0	0	0	
	X_3 : Solvente (S)	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	0	0	0	0	-1,68	1,68	-1,68	1,68	-1,68	1,68	-1,68	1,68	-1,68	1,68	0	0	0	0	0	0	
Valores naturais	X_1 : t (min)	40,3	40,3	40,3	40,3	99,7	99,7	99,7	99,7	120,0	20,0	70,0	70,0	70,0	70,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	120,0	120,0	120,0	120,0	70,0	70,0	70,0	70,0	70,0	70,0
	X_2 : T ($^{\circ}C$)	37,2	37,1	72,8	72,8	37,2	37,2	72,8	72,8	55,0	55,0	25,0	85,0	55,0	55,0	25,0	25,0	85,0	85,0	25,0	25,0	85,0	85,0	55,0	55,0	55,0	55,0	55,0	55,0	55,0
	X_3 : S (%)	20,3	79,7	20,3	79,7	20,3	79,7	20,3	79,7	50,0	50,0	50,0	50,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Variáveis de resposta para aplicação de MSR

<i>P1</i>	3,34	5,61	4,50	5,75	3,41	5,80	3,55	4,96	3,93	5,08	5,05	5,52	3,17	5,78	1,96	6,36	4,56	5,83	2,27	5,86	1,42	5,11	4,93	4,91	5,34	5,35	5,24	4,84
<i>P2</i>	2,47	4,24	2,64	4,15	2,38	4,27	2,26	3,72	2,55	3,32	3,15	2,92	2,31	5,31	1,78	4,85	2,50	4,11	1,83	4,22	1,45	3,83	3,43	3,54	3,47	3,48	3,44	3,29
<i>P3</i>	3,94	5,53	4,71	5,37	3,60	6,52	3,90	5,78	3,93	4,89	5,29	5,74	2,81	5,13	2,10	4,25	2,98	3,16	1,59	4,63	1,48	5,42	6,33	7,04	6,70	6,71	6,94	6,67
<i>P4</i>	2,95	5,68	2,82	5,05	2,93	6,60	2,71	5,01	3,70	4,26	4,98	4,97	1,66	4,60	1,79	5,27	1,47	4,67	1,59	4,61	1,39	5,12	4,59	4,57	4,78	4,79	4,40	4,42
<i>P5</i>	7,61	13,13	8,39	13,66	7,30	13,00	8,15	13,66	10,54	12,68	15,27	17,09	2,64	9,81	1,87	8,32	1,47	10,19	1,59	8,67	1,39	11,07	16,99	16,40	17,62	17,66	15,93	16,40
<i>P6</i>	3,47	5,69	3,78	5,34	3,48	4,99	3,52	5,02	3,91	5,09	5,68	5,74	1,70	4,01	1,74	4,70	1,47	3,76	1,59	3,99	1,37	3,25	6,35	6,10	6,62	6,64	6,34	6,31
<i>P7</i>	2,52	4,25	2,62	3,98	2,43	3,59	2,41	3,62	3,12	3,52	3,80	3,64	1,75	4,07	1,74	4,83	1,91	3,98	1,59	4,07	1,37	3,28	3,73	3,75	3,85	3,86	3,69	3,69
<i>P8</i>	3,53	5,93	3,67	5,39	3,40	6,22	3,36	5,03	3,95	5,09	5,42	5,28	1,96	3,84	1,85	4,65	1,47	3,82	1,59	3,96	1,37	3,49	5,86	5,64	5,88	5,89	6,01	5,57
<i>P9</i>	5,10	8,37	5,33	7,82	4,78	8,55	4,94	7,82	5,46	7,15	8,25	8,59	2,07	5,44	1,94	5,27	1,47	4,98	1,59	4,70	1,40	5,41	9,99	9,52	10,25	10,27	9,49	9,71
<i>P10</i>	14,92	21,10	16,36	24,14	14,84	18,68	16,01	24,14	21,50	23,40	26,73	30,48	6,96	14,17	2,29	9,46	2,35	13,48	1,59	10,19	1,43	17,38	32,57	32,82	33,99	34,06	32,48	33,27
<i>P11</i>	10,18	14,08	13,19	15,07	9,34	12,26	10,90	13,27	12,83	17,10	16,97	19,23	5,98	5,71	2,31	5,13	5,67	5,26	1,27	4,82	1,16	5,32	20,04	19,79	20,91	20,95	21,22	19,94
<i>P12</i>	2,91	4,60	3,27	4,31	2,66	4,10	2,76	3,81	3,22	4,13	4,19	4,26	2,20	4,09	1,92	4,80	2,74	4,17	1,59	4,29	1,41	3,54	3,93	3,80	3,83	3,84	3,94	3,83
<i>P13</i>	4,84	7,26	5,77	6,99	4,30	7,53	4,89	6,72	5,63	7,31	7,30	7,85	2,73	4,57	2,08	4,75	3,32	4,12	1,59	4,08	1,40	4,15	8,06	8,08	8,34	8,36	8,75	8,38
<i>TCA</i>	67,78	105,46	77,06	107,01	64,86	102,12	69,37	102,56	84,25	103,00	112,07	121,30	37,96	76,52	25,38	72,65	33,37	71,53	21,22	68,10	18,04	76,37	116,79	115,97	111,59	111,85	117,87	116,32
<i>Rendimento</i>	36,35	28,58	38,26	31,41	36,08	29,95	39,41	32,14	38,12	37,53	34,75	37,90	38,84	18,08	35,62	13,22	38,27	17,80	35,42	16,52	41,00	20,24	35,68	34,54	35,68	35,61	35,54	35,40

TCA – Total de compostos antociânicos; *P1*- Cianidina-3-(pC-6'-Caf)Sph isómero 1; *P2*- Cianidina-3-(pC-6'-Caf)Sph isómero 2; *P3*- Cianidina-3-(6-pC)Sph-5-(6-Mal)Glc; *P4*- Cianidina-3-(6pC)Glc-5-Glc; *P5*- Cianidina-3-(6-pC-6'-Caf)Sph-5-Glc isómero 1; *P6*- Cianidina-3-(6-pC-6'-Caf)Sph-5-(6-Mal)Glc isómero 1; *P7*- Cianidina-3-(6-pC-6'-Caf)Sph-5-(6-Mal)Glc isómero 2; *P8*- Cianidina-3-(6-pC-6'-Caf)Sph-5-Glc isómero 2; *P9*- Cianidina-3-(6,6'-dipC)Sph-5-Glc; *P10*- Cianidina-3-(6,6'-dipC)Sph-5-(6-Mal)Glc; *P11*- Pelargonidina-3-(6,6'-dipC)Sph-5-Glc; *P12*- Cianidina-3-(6-pC-X-Mal-6'-Caf)Sph-5-Glc; *P13*- Cianidina-3-(6-pC-X-Mal-6'-pC)Sph-5-Glc; pC – p-cumaroil; Sph- sofrósido; Caf – cafeoil; Mal – malonil; Glc – glucósido.

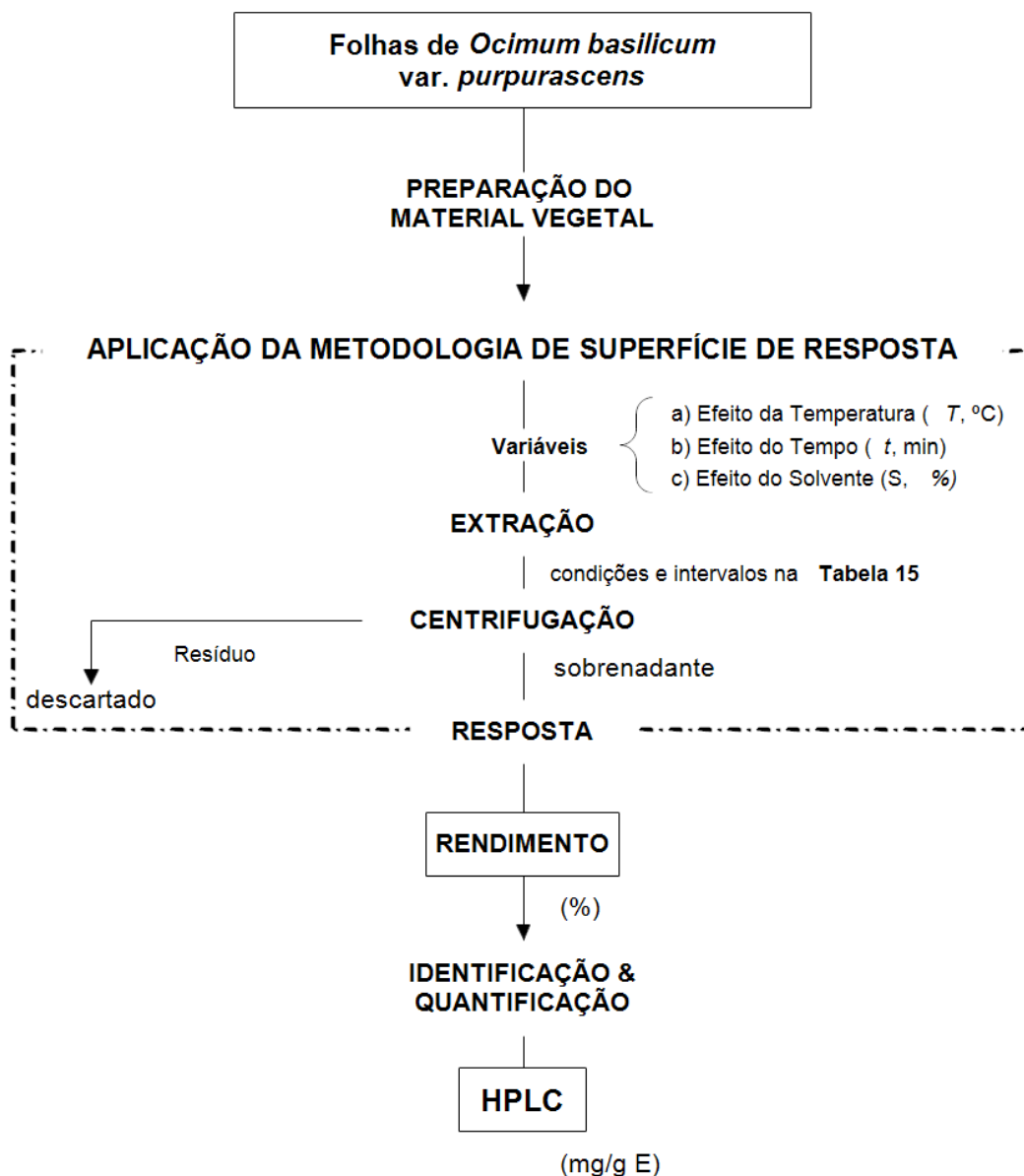


Figura 27. Diagrama das diferentes etapas executadas para otimizar as condições que maximizam as respostas de extração dos compostos antociânicos (mg/g E) e do resíduo total extraído (*Rendimento*, %).

4.5.2. Modelos de superfície de resposta teórica

Como em muitos campos de investigação, ao tentar desenvolver modelos teóricos para prever e compreender os efeitos das variáveis independentes sobre certas variáveis de resposta, é necessário avaliar a sua precisão ajustando esses modelos aos valores experimentais. Neste estudo, os valores de resposta (**Tabela 15**) foram ajustados a um modelo polinomial de segunda ordem usando um algoritmo não-linear (estimativas de mínimos quadrados) para desenvolver modelos matemáticos, para cada critério de resposta. A **Tabela 16** mostra os valores estimados de coeficiente obtidos a partir do

modelo polinomial da **Equação 6** e o coeficiente de correlação (R^2) para cada resposta paramétrica do processo de extração. Esses valores paramétricos traduzem os padrões de resposta e mostram a complexidade das possíveis interações entre variáveis. No entanto, nem todos os parâmetros da **Equação 6** foram utilizados para a construção do modelo, uma vez que alguns coeficientes não foram significativos (*ns*). Sendo que, os coeficientes significativos foram avaliados a nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$). A falta de ajuste estatístico, utilizada para testar a adequação dos modelos obtidos, demonstrou que não houve uma melhoria considerável com a inclusão dos valores estatísticos paramétricos *ns*.

Tabela 16. Coeficientes de ajuste e R^2 determinados para os modelos obtidos para compostos antocianicos individuais e agrupados, rendimento de extração (**Tabela 15**) e condições ótimas de HAE e valores de resposta.

Variáveis de resposta	Coeficientes de ajuste obtidos após a aplicação da equação polinomial de segunda ordem com termos interativos										Condições ótimas de processamento e valores de resposta				
	Interceção	Efeito Linear			Efeito Quadrático			Efeito interativo			R^2	t (min)	T (°C)	S (%)	Ótimo
	b_0	b_1 (t)	b_2 (T)	b_3 (S)	b_{11} (t ²)	b_{22} (T ²)	b_{33} (S ²)	b_{12} (tT)	b_{13} (tS)	b_{23} (TS)					
P1	5,06±0,15	-0,28±0,09	ns	0,92±0,09	-0,16±0,11	ns	-0,17±0,11	-0,17±0,06	0,07±0,06	-0,15±0,06	0,9441	81,06 ±2,08	25,00 ±1,73	100,00±1,58	6,56±0,31
P2	3,37±0,10	-0,15±0,06	ns	0,76±0,06	-0,20±0,07	ns	0,11±0,07	-0,04±0,00	ns	-0,07±0,04	0,9556	64,04 ±5,07	25,00 ±0,43	100,00±9,11	5,15±0,36
P3	31,23±1,68	ns	0,96±0,95	ns	-2,14±1,15	ns	-5,40±1,15	ns	0,98±0,68	ns	0,9359	70,00 ±3,94	85,00 ±6,07	50,00 ±3,80	32,85±2,47
P4	4,65±0,19	ns	-0,20±0,11	1,06±0,11	-0,11±0,01	ns	-0,41±0,13	ns	ns	ns	0,9225	70,00 ±5,49	25,00 ±1,94	88,44 ±5,39	5,67±1,05
P5	15,59±0,62	ns	0,33±0,22	2,42±0,35	-0,95±0,42	ns	-2,85±0,42	ns	ns	ns	0,9449	70,00 ±1,26	85,00 ±5,25	62,60 ±5,86	16,66±1,76
P6	5,90±0,27	-0,16±0,15	-0,10±0,01	0,74±0,15	-0,31±0,18	ns	-0,89±0,18	ns	ns	ns	0,9336	62,47 ±1,24	25,00 ±0,31	62,27 ±3,93	6,24±0,56
P7	3,63±0,08	-0,16±0,05	-0,09±0,05	0,70±0,05	-0,08±0,06	ns	-0,23±0,06	ns	ns	-0,07±0,03	0,9701	40,93 ±1,60	25,00 ±1,49	100,00±6,12	4,59±0,34
P8	5,59±0,18	-0,13±0,10	-0,14±0,10	0,77±0,10	-0,23±0,12	ns	-0,80±0,12	ns	ns	ns	0,9456	61,55 ±4,64	25,00 ±1,03	64,30 ±1,89	6,03±0,55
P9	9,06±0,43	ns	-0,12±0,02	1,15±0,24	-0,62±0,30	ns	-1,52±0,30	ns	ns	ns	0,9286	70,00 ±1,16	25,00 ±1,24	61,18 ±2,85	9,47±1,32
P10	29,87±1,32	ns	0,85±0,74	2,89±0,74	-2,07±0,91	ns	-6,27±0,91	ns	ns	ns	0,9377	70,00 ±1,42	85,00 ±2,46	56,85 ±0,94	31,63±2,42
P11	8,93±0,25	-0,32±0,14	-0,12±0,14	0,63±0,14	-0,47±0,17	ns	-1,64±0,17	ns	ns	-0,10±0,01	0,9359	59,99 ±5,19	25,00 ±0,59	57,18 ±0,16	9,28±0,38
P12	3,91±0,06	-0,22±0,03	-0,03±0,03	0,65±0,03	-0,06±0,04	ns	-0,25±0,04	-0,05±0,02	ns	-0,09±0,02	0,9757	36,49 ±0,30	25,00 ±1,21	98,54 ±9,29	4,71±0,20
P13	7,93±0,20	-0,26±0,11	-0,16±0,11	0,73±0,11	-0,37±0,03	ns	-1,37±0,13	ns	0,09±0,08	-0,10±0,01	0,9451	60,74 ±0,01	25,00 ±1,30	59,46 ±0,04	8,38±0,29
TCA	109,78±2,73	-1,93±1,54	1,07±0,32	14,30±1,54	-6,20±1,87	ns	-17,00±1,87	ns	ns	ns	0,9577	65,37 ±3,62	85,00 ±1,17	62,50 ±4,24	114,74±0,58
Rendí-mento	36,43±1,6	0,49±0,88	1,19±0,87	-5,56±0,87	ns	ns	-3,09±0,84	ns	ns	ns	0,9592	120,00±2,62	90,00 ±7,72	23,23 ±0,91	41,77±1,59

ns - coeficiente não significativo; R^2 - coeficiente de correlação.

Os modelos resultantes para cada uma das 15 respostas avaliadas (*PI a PI3, TCA e Rendimento*) são apresentados na **Tabela 17**. Para todos os casos, foram obtidos coeficientes R^2 superiores a 0,92 (**Tabela 16**), o que indica que a percentagem de variabilidade de cada resposta pode ser explicada pelo modelo usado. Estes modelos viáveis foram aplicados nas etapas subsequentes de previsão e otimização, mostrando uma boa concordância entre os valores experimentais e os previstos, o que indica que a variação é explicada pelas variáveis independentes.

Os coeficientes do modelo obtido (**Tabela 16**) são empíricos e não podem ser associados à significância física ou química. No entanto, são úteis para prever os resultados das condições de extração não testadas (Ranic et al., 2014). O sinal do efeito marca o desempenho da resposta. Desta forma, quando um fator tem um efeito positivo, a resposta é maior a um nível alto, e quando um fator tem um efeito negativo, a resposta é menor a um nível alto. Quanto maior o valor absoluto de um coeficiente, mais importante é o peso da variável correspondente. Com base nas expressões matemáticas (**Tabela 17**), são exibidas determinadas características relativas aos efeitos gerais das variáveis. A relevância dos valores paramétricos significativos podem ser ordenados em função das variáveis envolvidas, de forma decrescente como $S > t > T$. Autores anteriores (Alexandre et al., 2017a) verificaram que a variável S é a mais relevante na extração utilizando a tecnologia HAE de compostos bioativos de matrizes semelhantes. No que diz respeito aos efeitos paramétricos lineares, quadráticos e interativos das equações desenvolvidas, verificou-se que desempenham um papel importante e significativo em todas as respostas avaliadas. Sendo que, para o efeito linear, as variáveis S e t apresentaram valores mais relevantes, enquanto que o efeito da variável T foi menos importante em quase todos os casos. Todas as variáveis independentes tiveram efeitos moderados quadráticos ou não lineares. Em relação aos efeitos interativos, as interações entre as variáveis ($t-T$, $T-S$ e $t-S$) foram de menor relevância. De forma a tornar os efeitos combinados mais explícitos e descrever visualmente as tendências de extração, apresentam-se os resultados em gráficos de superfície de resposta discutidos abaixo. As condições ideais de HAE que maximizam a recuperação dos compostos antociânicos das folhas de manjeriço vermelho rubi são apresentadas na **Tabela 16**.

Tabela 17. Modelos matemáticos do processo de extração derivados do modelo polinomial de segunda ordem com interações da **Equação 6**.

<i>P1</i> : Cianidina-3-(pC-6'-Caf)Sph isómero 1	$Y_{P1} = 5,06 - 0,28t + 0,92S - 0,16t^2 - 0,17S^2 - 0,17tT + 0,07tS - 0,15TS$	Eq. (7)
<i>P2</i> : Cianidina-3-(pC-6'-Caf)Sph isómero 2	$Y_{P2} = 3,37 - 0,15t + 0,76S - 0,20t^2 - 0,11S^2 - 0,04tT - 0,07TS$	Eq. (8)
<i>P3</i> : Cianidina-3-(6-pC)Sph-5-(6-Mal)Glc	$Y_{P3} = 31,23 + 0,96T - 2,14t^2 - 5,40S^2 + 0,98tS$	Eq. (9)
<i>P4</i> : Cianidina-3-(6pC)Glc-5-Glc	$Y_{P4} = 4,65 - 0,20T + 1,06S - 0,11t^2 - 0,41S^2$	Eq. (10)
<i>P5</i> : Cianidina-3-(6-pC-6'-Caf)Sph-5-Glc isómero 1	$Y_{P5} = 15,59 + 0,33T + 2,42S - 0,95t^2 - 2,85S^2$	Eq. (11)
<i>P6</i> : Cianidina-3-(6-pC-6'-Caf)Sph-5-(6-Mal)Glc isómero 1	$Y_{P6} = 5,90 - 0,16t - 0,10T + 0,74S - 0,31t^2 - 0,89S^2$	Eq. (12)
<i>P7</i> : Cianidina-3-(6-pC-6'-Caf)Sph-5-(6-Mal)Glc isómero 2	$Y_{P7} = 3,63 - 0,16t - 0,09T + 0,70S - 0,08t^2 - 0,23S^2 - 0,07TS$	Eq. (13)
<i>P8</i> : Cianidina-3-(6-pC-6'-Caf)Sph-5-Glc isómero 2	$Y_{P8} = 5,59 - 0,13t - 0,14 + 0,77S - 0,23t^2 - 0,80S^2$	Eq. (14)
<i>P9</i> : Cianidina-3-(6,6'-dipC)Sph-5-Glc	$Y_{P9} = 9,06 - 0,12T + 1,15S - 0,62t^2 - 1,52S^2$	Eq. (15)
<i>P10</i> : Cianidina-3-(6,6'-dipC)Sph-5-(6-Mal)Glc	$Y_{P10} = 29,87 + 0,85T + 2,89S - 2,07t^2 - 6,27S^2$	Eq. (16)
<i>P11</i> : Pelargonidina-3-(6,6'-dipC)Sph-5-Glc	$Y_{P11} = 8,93 - 0,32t - 0,12 + 0,63S - 0,47t^2 - 1,64S^2 - 0,10TS$	Eq. (17)
<i>P12</i> : Cianidina-3-(6-pC-X-Mal-6'-Caf)Sph-5-Glc	$Y_{P12} = 3,91 - 0,22t - 0,03T + 0,65S - 0,06t^2 - 0,25S^2 - 0,05tT - 0,09TS$	Eq. (18)
<i>P13</i> : Cianidina-3-(6-pC-X-Mal-6'-pC)Sph-5-Glc	$Y_{P13} = 7,93 - 0,26t - 0,16T + 0,73S - 0,37t^2 - 1,37S^2 + 0,09tS - 0,10TS$	Eq. (19)
<i>TAC</i>	$Y_{TAC} = 109,78 - 1,93t + 1,07T + 14,30S - 6,20t^2 - 17,00S^2$	Eq. (20)
<i>Rendimento</i>	$Y_{Yield} = 36,43 + 0,49t + 1,19T - 5,56S - 3,09S^2$	Eq. (21)

pC – *p*-cumaroil; Sph- soforósido; Caf – cafeoil; Mal – malonil; Glc – glucósido.

4.5.3. *Efeito das variáveis independentes nas respostas e condições ótimas de extração*

Embora os resultados paramétricos possam retratar os padrões das respostas, as representações gráficas em 3D e 2D ajudam a ter uma compreensão mais clara. A **Figura 28** mostra os gráficos de superfície de resposta do rendimento de extração, do *TCA* e de duas antocianinas representativas extraídas (*PI* e *PI0*), bem como sua análise estatística. A **Figura 28** está dividida em duas subsecções: i) a subsecção A, que ilustra os gráficos da superfície de resposta 3D, cujas superfícies foram preditas com o respetivo modelo polinomial de segunda ordem descrito pela **Equação 6**, utilizando os valores teóricos apresentados na **Tabela 16**. Para representação dessas combinações binárias, a variável excluída foi posicionada no melhor de seu domínio experimental (**Tabela 16**); e ii) a subsecção B ilustra a adequação do ajuste através de dois critérios estatísticos gráficos, a capacidade de simular mudanças de resposta entre valores observados e previstos e a distribuição residual como uma função de cada variável.

Observando os gráficos de superfície de resposta do rendimento de extração (**Figura 28**), é possível verificar que a quantidade de material extraído aumenta para um valor ótimo, assim, na maioria dos casos, diminui em função da variável independente envolvida. Conseqüentemente, o valor ótimo pode ser encontrado como sendo um único ponto em quase todas as combinações, o que permite calcular as condições de extração que levam a um máximo absoluto.

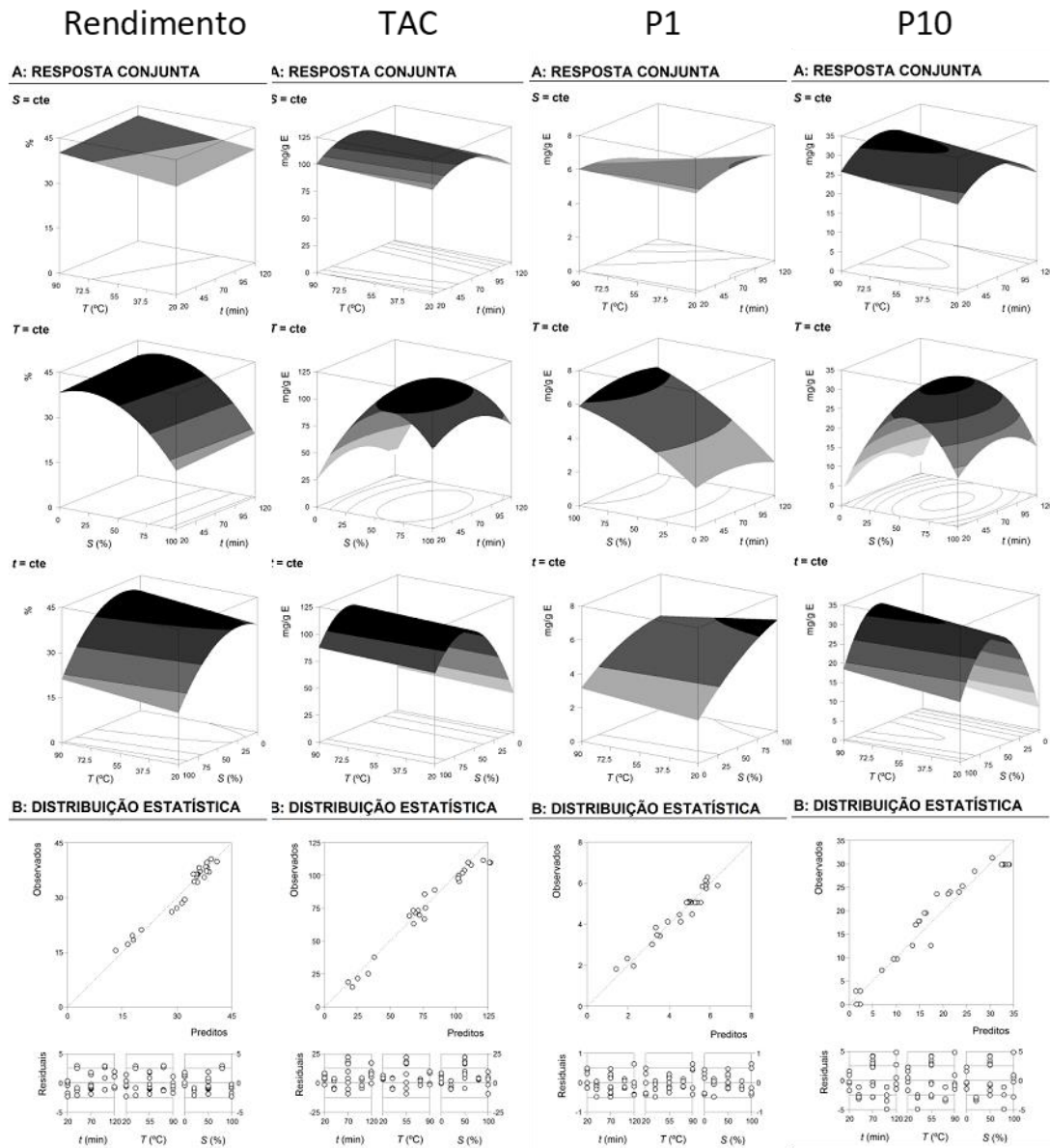


Figura 28. Ilustração dos resultados gráficos do método de superfície de resposta do rendimento de extração e compostos antociânicos maioritários e totais.

Parte A: Análise 3D em função de cada variável independente. As superfícies foram construídas usando os valores teóricos (Tabela 16) previstos com a Equação 6. Para fins de representação, a variável excluída foi posicionada no melhor de seu domínio experimental (Tabela 16). Parte B: ilustração da qualidade do ajustamento através de dois critérios estatísticos gráficos, nomeadamente a capacidade de simular as alterações de resposta entre os valores observados e os valores previstos e a distribuição residual em função de cada variável.

Os valores ótimos de extração, para as respostas apresentadas na **Figura 28**, foram obtidos usando condições muito diferentes de HAE (Tabela 16), resumidamente:

Para o *rendimento*, as condições variáveis ótimas foram encontradas a: $t = 120.00 \pm 2.62$ min, $T = 85.00 \pm 7.72$ °C e $23.23 \pm 0.91\%$ de etanol (*v/v*), produzindo valores máximos de resposta de $41.77 \pm 1.59\%$ de rendimento.

1. Para o *TCA*, as condições variáveis ótimas foram encontradas a: $t= 65.37 \pm 3.62$ min, $T= 85.00 \pm 1.17$ °C e $62.50 \pm 4.24\%$ de etanol (v/v), produzindo valores máximos de resposta de 114.74 ± 0.58 mg/g de E.
2. Para *PI*, as condições variáveis ótimas foram encontradas a: $t= 81.06 \pm 2.08$ min, $T= 25.00 \pm 1.73$ °C e $100.00 \pm 1.58\%$ de etanol (v/v), produzindo valores máximos de resposta de 6.56 ± 0.31 mg/g de E.
3. Para *PI0*, as condições variáveis ótimas foram encontradas a: $t= 70.00 \pm 1.42$ min, $T= 85.00 \pm 2.46$ °C e $56.85 \pm 0.94\%$ de etanol (v/v), produzindo valores máximos de resposta de 31.63 ± 2.42 mg/g de E.

De acordo com a literatura, o uso de elevadas concentrações de solvente aumenta a extração de compostos bioativos de matrizes de plantas (Alexandre et al., 2017b). A HAE, para além de ser um método de extração rápido, permitindo poupar tempo, também está associado a um baixo consumo de energia, comparativamente a outros métodos de extração (Jun, 2009). Neste estudo, também se verificou que as condições de HAE que maximizam o rendimento do extrato bruto e a recuperação dos compostos antociânicos diferem, principalmente no tempo de processamento requerido e na concentração de etanol. Deste modo, os extratos obtidos segundo as condições ótimas estabelecidas para os compostos antociânicos (**Tabela 16**), terão uma baixa concentração de compostos não antociânicos, tornando assim o processo de recuperação mais seletivo para os compostos alvo.

Os efeitos das variáveis independentes na extração dos compostos antociânicos individuais a partir das folhas do manjeriço vermelho rubi estão representados na **Figura 29**. As condições de processamento que geraram valores de resposta ótimos (⊙) estão numericamente descritas na **Tabela 16**. Os compostos antociânicos identificados foram organizados em função da quantidade máxima extraída (mg/g de extrato) por ordem decrescente: P3 (32,85) > P10 (31,63) >> P5 (16,66) >> P9 (9,47) > P11 (9,28) > P13 (8,38) > P1 (6,56) > P6 (6,24) > P8 (6,03) > P4 (5,67) > P2 (5,15) > P7 (4,59) > P12 (4,71).

Os valores mais elevados de extração, alcançados nas condições otimizadas, comprovam que a HAE aliado a uma MSR é um processo inovador para recuperar uma maior quantidade de compostos antociânicos a partir das folhas de manjeriço vermelho rubi, usando tempos de processamento mais curtos e solventes mais verdes.

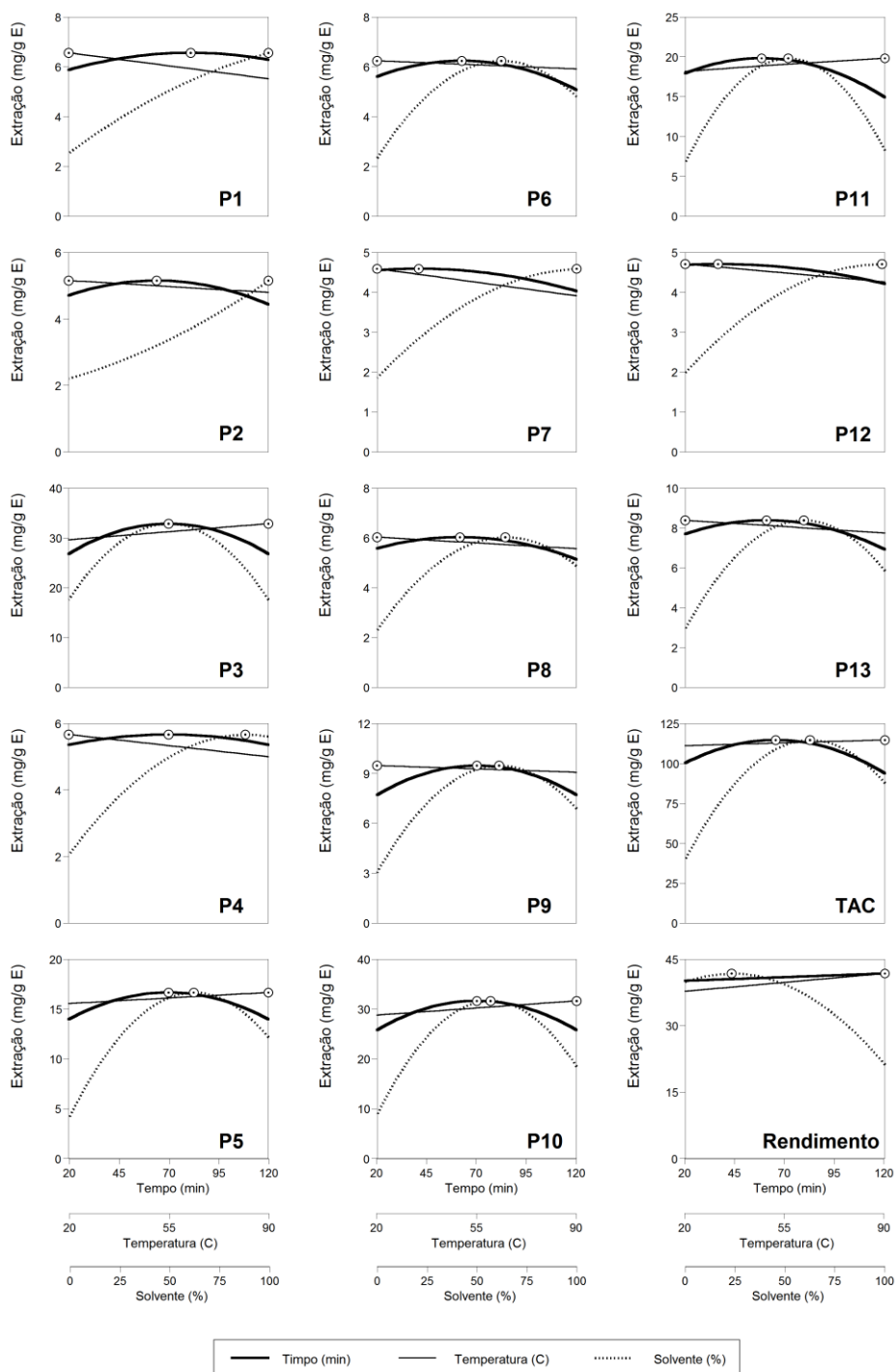


Figura 29. Resposta gráfica em 2D dos efeitos das variáveis independentes na extração de compostos antocianicos das folhas de manjericão vermelho rubi. (ver Tabela 11 e Figura 26 para a identificação dos pico). Pontos (⊙) representam os valores ótimos. Em cada parcela, cada variável independente foi posicionada no valor ótimo das outras duas variáveis (Tabela 16).

4.5.4. Agrupamento dos compostos antociânicos de acordo com as condições de HAE que maximizam a sua extração

Na **Tabela 18** mostra os valores máximos de resposta de cada composto antociânico e os seus valores se extraídos sob as condições ótimas de HAE de cada compostos individualmente (**Tabela 16**). Os valores apresentados na parte B da **Tabela 18** foram calculados dividindo o valor ótimo de cada composto pelo máximo dos restantes compostos. Portanto, quando dois compostos exibem o valor 1 (correspondendo a valores de 100%), o valor de resposta ótimo de ambos os compostos é alcançado sob as mesmas condições de HAE. Como exemplo, os compostos P 1, 2, 4, 7 e 12, sendo estes agrupados em C1 sob as mesmas condições de HAE (**Figura 30**). Por sua vez, quando são exibidos valores dissimilares de 1, isso significa que as condições que maximizam a extração de um determinado composto não favorecem a extração do outro (compostos 1 e 13).

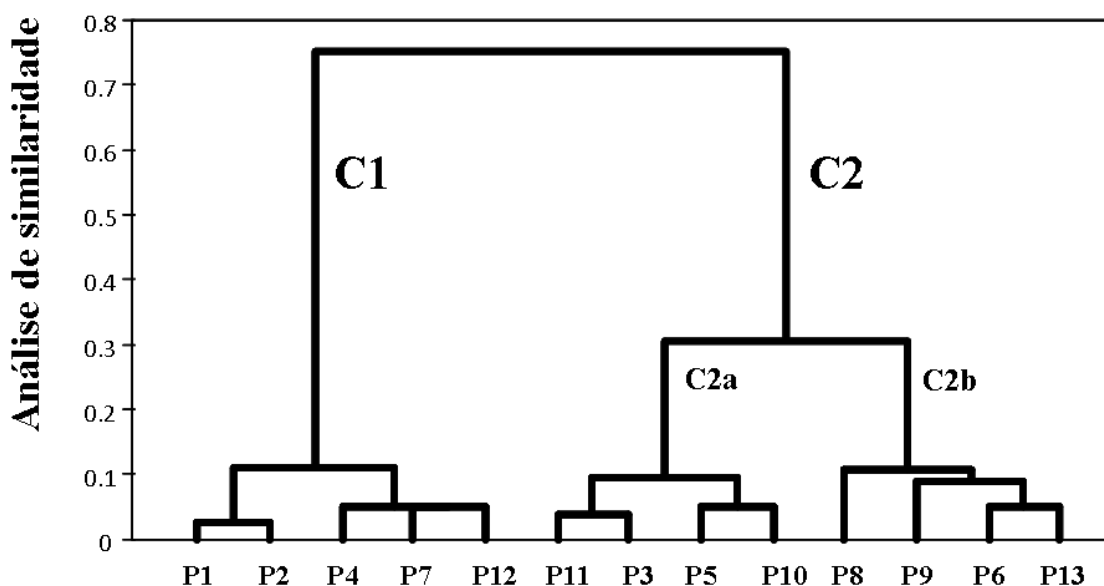


Figura 30. Dendrograma de HCA de compostos antociânicos de acordo com as condições de HAE que maximizam a sua extração a partir das folhas de manjeriço vermelho rubi.

Utilizando o conjunto de dados completo da **Tabela 18** e realizando um problema de otimização multiobjectivo, usando um algoritmo de agrupamento apropriado, foram criados diferentes grupos de compostos antociânicos cujos valores máximos de resposta são obtidos sob condições semelhantes de extração de HAE.

Tabela 18. Valores máximos de resposta de cada composto antociânico e seus valores nas condições ótimas de processamento restantes compostos apresentados na **Tabela 16**.

A) Valores máximos de resposta (mg/g de extrato) dos compostos individuais de antocianina													
Pico:	<i>P1</i>	<i>P2</i>	<i>P3</i>	<i>P4</i>	<i>P5</i>	<i>P6</i>	<i>P7</i>	<i>P8</i>	<i>P9</i>	<i>P10</i>	<i>P11</i>	<i>P12</i>	<i>P13</i>
Ótimo:	6,56	5,15	32,85	5,67	16,66	6,24	4,59	6,03	9,47	31,63	9,28	4,71	8,38

B) Valores de cada composto antociânico nas condições ótimas dos outros compostos													
	<i>P1</i>	<i>P2</i>	<i>P3</i>	<i>P4</i>	<i>P5</i>	<i>P6</i>	<i>P7</i>	<i>P8</i>	<i>P9</i>	<i>P10</i>	<i>P11</i>	<i>P12</i>	<i>P13</i>
<i>P1</i>	1	0,99	0,77	0,96	0,81	0,84	0,95	0,85	0,83	0,79	0,81	0,94	0,82
<i>P2</i>	0,99	1	0,65	0,91	0,71	0,73	0,98	0,74	0,72	0,68	0,70	0,95	0,71
<i>P3</i>	0,45	0,42	1	0,63	0,97	0,87	0,33	0,85	0,88	0,99	0,88	0,33	0,88
<i>P4</i>	0,99	0,99	0,76	1	0,83	0,94	0,97	0,95	0,94	0,80	0,92	0,97	0,93
<i>P5</i>	0,65	0,66	0,97	0,80	1	0,93	0,61	0,93	0,93	0,99	0,92	0,61	0,93
<i>P6</i>	0,75	0,77	0,92	0,89	0,94	1	0,74	1,00	1,00	0,94	1,00	0,75	1,00
<i>P7</i>	0,97	0,99	0,76	0,97	0,80	0,90	1	0,91	0,88	0,79	0,87	1,00	0,88
<i>P8</i>	0,79	0,81	0,89	0,91	0,92	1,00	0,79	1	1,00	0,91	0,99	0,80	1,00
<i>P9</i>	0,72	0,72	0,93	0,86	0,96	1,00	0,66	0,99	1	0,95	0,99	0,66	0,99
<i>P10</i>	0,48	0,49	0,99	0,69	0,99	0,90	0,43	0,89	0,91	1	0,90	0,44	0,90
<i>P11</i>	0,61	0,63	0,94	0,80	0,93	0,99	0,61	0,99	0,99	0,94	1	0,63	1,00
<i>P12</i>	0,97	0,99	0,82	0,98	0,85	0,91	1,00	0,92	0,90	0,84	0,89	1	0,90
<i>P13</i>	0,69	0,70	0,91	0,84	0,91	1,00	0,67	1,00	1,00	0,92	1,00	0,68	1

Os resultados da extração dos compostos antociânicos através de HAE são apresentados na **Figura 30**. No dendrograma HCA (análise hierárquica de cluster), a menor distância entre os compostos indica maior similaridade em termos de condições que favorecem a sua extração, sendo que compostos do mesmo grupo são melhor extraídos sob condições similares de HAE. Foram gerados dois clusters significativos (C1 e C2), onde C2 foi dividido em dois subgrupos pertinentes (a e b). Além disso, foram criados outros subgrupos, porém menos relevantes, podendo ser considerados como um ruído residual produzido pelo algoritmo.

- I. O cluster C1 incluiu os compostos *P 1, 2, 4, 7 e 12*. A extração destes compostos foi maximizada quando se utilizou um *t* intermédio, uma concentração de *S* alta e uma *T* baixa/alta (**Tabela 16 e Figura 28**). Os subgrupos foram diferenciados principalmente pelos valores de *T*.
- II. O cluster C2 incluiu os restantes compostos *P 11, 3, 5, 10, 8, 9, 6 e 13*, que foram subdivididos em C2a e C2b. A extração dos compostos em C2a foi maximizada quando a *T* aplicada foi baixa e a concentração do *S* foi intermédia. Por outro lado, os compostos em C2b foram maximizados com uma *T* alta e uma concentração de *S* intermédia.

Embora se esperasse que os compostos com características químicas semelhantes exibissem condições ótimas de extração comparáveis, a análise de HCA foi uma abordagem interessante e inovadora no campo de extração de compostos de alto valor acrescentado de fontes naturais, uma vez que esta análise destacou as condições adequadas de HAE para maximizar a recuperação simultânea de grupos específicos de compostos a partir das folhas de manjeriço vermelho rubi.

4.5.5. *Análise dose-resposta do efeito sólido-líquido nas condições ótimas*


Devido aos resultados precisos de HPLC, os estudos sobre *S/L* foram realizados em condições ótimas previstas pelos modelos polinomiais obtidos para a HAE, utilizando o conteúdo de antocianinas totais como resposta. Resultados preliminares (dados não mostrados neste trabalho) indicam que o valor limite experimental da concentração foi próximo de 30 g/L, devido à agitação experimental condicionada para valores maiores de *S/L*. Portanto, o processo de extração utilizado foi projetado para verificar o comportamento de *S/L* entre 1 g/L até 30 g/L. As respostas obtidas são consistentes com os resultados anteriores. Em todos os casos, o efeito *S/L* pode ser descrito por uma relação linear simples com um intercepto, mostrando padrões ligeiramente decrescentes em função do aumento da *S/L*. No entanto, os padrões decrescentes explicados pelo coeficiente paramétrico do declive, não foram significativos ao nível do intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$), assim o efeito decrescente foi rejeitado para posterior análise. Embora as conclusões da análise sejam excluídas, em termos globais, pode-se postular que o aumento do *S/L* tem um leve efeito na extração do TCA, sendo que os efeitos de saturação não se verificam até à concentração máxima testada (30 g/L), portanto o valor ótimo de da razão *S/L* foi estipulada a 15 g/L.

Estes valores ótimos supõem um aumento de 64% na quantidade de antocianinas totais, comparativamente com os valores obtidos aquando da utilização das condições padronizadas de extração, onde se fazem duas extrações sucessivas ($40,8 \pm 0,1$ mg AT/g E, **Tabela 11**).

4.6. Avaliação do potencial corante do extrato rico em antocianinas obtido das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens* pelo processo de extração otimizado

O resultado da análise cromática no espaço de cor CIE L^* a^* b^* do extrato corante à base de antocianinas presentes nas folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens* está representado na **Tabela 19**. A cor do extrato corante revelou um valor de L^* de $20,5 \pm 0,5$ e os parâmetros a^* e b^* valores de $33,0 \pm 0,1$ e $8,2 \pm 0,4$, respetivamente. Comparando estes resultados com avaliação da cor feita anteriormente às folhas frescas e ao pó liofilizado das folhas secas do manjeriço vermelho rubi, verifica-se, tal como esperado, uma melhoria significativa da cor púrpura. O valor de L^* , que expressa a luminosidade (0 a 100) da cor das amostras, revelou que o extrato corante tem uma cor mais escura que as folhas frescas ($35,6 \pm 0,9$) e que o pó liofilizado (31 ± 1). No que concerne ao parâmetro a^* , que avalia a intensidade da cor de verde até vermelho (-120 a 120), este comprovou que o extrato corante tem tonalidades mais vermelhas que as folhas frescas ($7,6 \pm 0,1$) e o pó liofilizado ($5,3 \pm 0,2$). Quanto ao parâmetro b^* , onde a cor é avaliada a nível de intensidade de azul para amarelo (-120 a 120), os valores mostraram que o extrato corante tem um tom de azul menos intenso comparativamente com as folhas frescas ($1,11 \pm 0,05$) e com o pó liofilizado ($3,7 \pm 0,1$). Para melhor compreensão dos valores da cor, estes foram convertidos em valores RGB através de um programa (<<http://www.easyrgb.com/en/convert.php>>), onde se pode visualizar a cor obtida do extrato, que foi vermelho-bordô. Estes resultados são justificados pelo facto de o extrato corante ser rico em compostos antociânicos, que para além de terem tonalidades mais escuras, também são caracterizados por apresentarem tons azuis, vermelhos e púrpura. A quantidade de compostos antociânicos totais obtidos no extrato otimizado foi similar ao previsto pelo modelo.

Tabela 19. Quantidade de antocianinas (derivados de cianidina e pelargonidina) no extrato corante e os seus parâmetros de cor nas condições ótimas (média \pm DP).

Quantificação (mg/g E)	L^*	a^*	b^*	Cor da conversão em valores RGB
$115,4 \pm 0,4$	$20,5 \pm 0,5$	$33,0 \pm 0,1$	$8,2 \pm 0,4$	

L^* - luminosidade; a^* eixo cromático de verde (-) a vermelho (+); b^* , eixo cromático de azul (-) a amarelo.

4.7. Avaliação das propriedades bioativas do extrato rico em antocianinas obtido das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens* pelo processo de extração otimizado

Os resultados da atividade antioxidante do extrato corante à base de antocianinas presentes nas folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens* encontram-se na **Tabela 20**. O extrato corante revelou valores de EC₅₀ maiores que o extrato hidroetanólico extraído utilizando o método tradicional, no entanto o ensaio que demonstrou menor poder antioxidante foi a inibição da descoloração do β-caroteno, tanto para o extrato hidroetanólico (EC₅₀=93 ± 9 µg/mL) como para o extrato corante. Os resultados do ensaio do poder redutor não demonstram uma diferença significativa entre o extrato hidroetanólico (EC₅₀=68,1 ± 0,3 µg/mL) e o extrato corante rico em antocianinas obtido através de condições de extração ótimas. Estes valores levam a concluir que o extrato corante tem menor poder antioxidante comparativamente ao extrato hidroetanólico. Esta pequena diminuição relativamente ao potencial antioxidante do extrato corante rico em antocianinas pode ser explicada pelo facto de este tipo de extrato não possuir a mesma concentração de ácido rosmarínico que o extrato hidroetanólico.

Tabela 20. Atividade antioxidante do extrato corante rico em antocianinas obtido nas condições ótimas de extração (média ± DP).

Atividade antioxidante (valores EC ₅₀ , µg/mL)	Extrato rico em antocianinas
Atividade de eliminação DPPH	113 ± 9
Poder Redutor	73 ± 1
Inibição do branqueamento de β-caroteno	245 ± 10

* EC₅₀: Concentração de extrato correspondendo a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 da absorvância no ensaio do poder redutor. Trolox (control positivo) Valores EC₅₀: 42 µg/mL (atividade captadora de radicais DPPH), 41 µg/mL (poder redutor), e 18 µg/mL (inibição da descoloração do β-caroteno).

A **Tabela 21** apresenta os resultados da atividade antimicrobiana obtidos para o extrato corante rico antocianinas presentes nas folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*.

Os resultados demonstram que o extrato corante apresenta atividade antibacteriana para todos microrganismos, no entanto os melhores resultados são obtidos frente às estirpes *Bacillus cereus* (CMI= 0,037 mg/mL; CMB=0,075 mg/mL) e *Escherichia coli* (CMI= 0,037 mg/mL; CMB=0,075 mg/mL). Também no extrato hidroetanólico

verifica-se que a bactéria *Bacillus cereus* (CMI= 0,10 mg/mL; CMB=0,15 mg/mL) é a mais sensível aos compostos do extrato. No entanto o extrato corante também revelou uma alta atividade contra *Listeria monocytogenes* (CMI= 0,05 mg/mL; CMB=0,075 mg/mL), *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae* (CMI= 0,075 mg/mL; CMB=0,15 mg/mL) e *Salmonella typhimurium* (CMI= 0,15 mg/mL; CMB=0,30 mg/mL). Já para o extrato hidroetanólico os valores de CMI e CMB das restantes bactérias não foram tão baixos como para este extrato, no entanto apresenta valores que demonstram atividade antibacteriana (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae*, com valores de CMI e CMB de 0,15 e 0,30 mg/mL, respetivamente).

Quanto atividade antifúngica o extrato corante revelou um alto potencial frente à maioria dos fungos testados. Sendo que *Aspergillus ochraceus* foi a espécie mais suscetível, tanto para o extrato corante (CMI= 0,002 mg/mL; CMF=0,075 mg/mL) como para o hidroetanólico (CMI= 0,037 mg/mL; CMF=0,075 mg/mL). Contudo não se verificou atividade antifúngica do extrato corante frente a *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* (CMI= 0,30 mg/mL; CMF=0,45 mg/mL), no entanto o extrato hidroetanólico apresentou um efeito antifúngico frente a esta espécie (CMI= 0,10 mg/mL; CMF=0,15 mg/mL).

Quando se comparam os resultados obtidos pelo extrato corante rico em compostos antociânicos com os controlos positivos, na maioria das bactérias e fungos testados, os valores de CMI e CMB/CMF foram mais baixos, o que indica uma excelente atividade antimicrobiana deste extrato.

Com estes resultados verifica-se que o extrato corante tem melhor atividade antimicrobiana comparativamente ao extrato hidroetanólico, o que pode ser explicado devido a uma maior presença de compostos antociânicos que possuem uma melhor potencial antimicrobiana (Sun et al., 2018).

Tabela 21. Atividade antibacteriana (CMI e CMB mg/mL) e antifúngica (CMI e CMF mg/mL) do extrato corante rico em antocianinas obtido nas condições ótimas de extração.

		Atividade Antibacteriana					
		<i>B.c.</i>	<i>S.a.</i>	<i>L.m.</i>	<i>E.c.</i>	<i>En.cl.</i>	<i>S.t.</i>
Extrato rico em antocianinas	CMI	0,037	0,075	0,05	0,037	0,075	0,15
	CMB	0,075	0,15	0,075	0,075	0,15	0,30
Estreptomicina	CMI	0,10	0,04	0,20	0,20	0,20	0,20
	CMB	0,20	0,10	0,30	0,30	0,30	0,30
Ampicilina	CMI	0,25	0,25	0,40	0,40	0,25	0,75
	CMB	0,40	0,45	0,50	0,50	0,50	1,20

		Atividade Antifúngica					
		<i>A.fun.</i>	<i>A.o.</i>	<i>A.n.</i>	<i>P.f.</i>	<i>P.o.</i>	<i>P.v.c.</i>
Extrato rico em antocianinas	CMI	0,037	0,002	0,075	0,075	0,30	0,30
	CMF	0,075	0,075	0,15	0,15	0,45	0,45
Cetoconazol	CMI	0,25	0,20	0,20	0,20	2,50	0,20
	CMF	0,50	0,50	0,50	0,50	3,50	0,30
Bifonazol	CMI	0,15	0,10	0,15	0,20	0,20	0,10
	CMF	0,20	0,20	0,20	0,25	0,25	0,20

B.c.: *Bacillus cereus*; *S.a.*: *Staphylococcus aureus*; *L.m.*: *Listeria monocytogenes*; *E.c.*: *Escherichia coli*; *En.cl.*: *Enterobacter cloacae*; *S.t.*: *Salmonella typhimurium*; *A.fun.*: *Aspergillus fumigatus*; *A.o.*: *Aspergillus ochraceus*; *A.n.*: *Aspergillus niger*; *P.f.*: *Penicillium funiculosum*; *P.o.*: *Penicillium ochrochloron*; *P.v.c.*: *Penicillium verrucosum var. cyclopium*. CMI – concentração mínima inibitória; CMF – concentração mínima fungicida; CMB – concentração mínima bactericida.

A **Tabela 22** estão representados os resultados obtidos nos ensaios de atividade citotóxica e hepatotóxica nos extratos ricos em compostos antociânicos, obtidos através de condições ótimas de extração. Contrariamente ao extrato hidroetanólico, que não apresentou capacidade anti-proliferativa sobre as linhas celulares tumorais testadas, o extrato corante rico em antocianinas revelou inibição do crescimento celular nas linhas HeLa ($GI_{50} = 213 \pm 9 \mu\text{g/mL}$) e HepG2 ($GI_{50} = 198 \pm 9 \mu\text{g/mL}$). Estes resultados podem ser consequência de concentrações mais elevadas de compostos antociânicos no extrato corante, que conferem uma maior atividade citotóxica, pois estes compostos têm sido descritos como tendo um potencial citotóxico (Zhou et al., 2018).

Tal como o extrato hidroetanólico, também o extrato corante não apresenta hepatotoxicidade frente à cultura de células primária PLP2, obtendo-se valores de $GI_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$.

Tabela 22. Atividade citotóxica e hepatotóxica do extrato corante rico em antocianinas obtido nas condições ótimas de extração (média \pm DP).

Concentrações	
Linhas celulares tumorais (Valores GI₅₀, µg/mL)	
MCF-7 (carcinoma mamário)	>400
NCI-H460 (carcinoma pulmonar)	>400
HeLa (carcinoma cervical)	213 \pm 9
HepG2 (carcinoma hepatocelular)	198 \pm 9
Células não tumorais (Valores GI₅₀, µg/mL)	
PLP2	>400

Valores GI₅₀ – concentração que inibiu 50% do crescimento celular. Valores GI₅₀ de Elipticina (controlo positivo): 1,21 µg/mL (MCF-7), 1,03 µg/mL (NCI-H460), 0,91 µg/mL (HeLa), 1,10 µg/mL (HepG2) e 2,29 µg/mL (PLP2).

5. Considerações finais

5. Considerações finais e perspectivas futuras

Os corantes são um dos aditivos mais importantes em termos de marketing, já que a sua presença em produtos alimentares influencia as percepções, escolhas e preferências dos consumidores. *O. basilicum* var. *purpurascens* (manjeriço vermelho rubi) é uma variedade da espécie *O. basilicum* L. com um elevado interesse em vários sectores, não só pelas suas características aromáticas e medicinais, mas também pelos seus pigmentos naturais. Vários estudos foram encontrados na literatura sobre diferentes variedades e/ou culturas de *O. basilicum*, no entanto, ainda são poucos os estudos sobre a variedade manjeriço vermelho rubi.

Assim, esta dissertação permitiu a caracterização a nível de parâmetros físicos (cor), nutricionais e químicos das folhas liofilizadas de *O. basilicum* var. *purpurascens*, bem como a avaliação das suas propriedades bioativas e o desenvolvimento de metodologias de otimização para a obtenção de um corante natural rico em antocianinas.

No que diz respeito ao pré-tratamento da amostra, a liofilização provou ser um bom processo de secagem, causando uma perda de cor mínima e consequentemente mantendo os compostos antociânicos. Em relação ao valor nutricional, verificou-se maior concentração de hidratos de carbono e menor teor de gordura. Relativamente à avaliação da composição química, esta demonstrou que a planta estudada é rica em moléculas de interesse, destacando-se a presença da glucose e do ácido quínico como principais moléculas de açúcares livres e ácidos orgânicos, respetivamente. No que concerne aos tocoferóis, foram encontradas quatro isoformas (α -, β -, γ - e δ -), contudo o γ -tocoferol foi a isoforma detetada em maior concentração, permitindo constatar a promissora capacidade antioxidante desta espécie.

A fim de tornar mais completa a avaliação química das folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens* foi avaliada a composição em ácidos gordos, verificando-se que os ácidos gordos polinsaturados foram o grupo de ácidos gordos com maior percentagem, tendo sido o ácido α -linolénico o composto maioritário.

A determinação dos compostos fenólicos do extrato hidroetanólico de manjeriço vermelho rubi, apresentou vinte e seis compostos fenólicos, onde treze das moléculas foram identificadas como compostos fenólicos não-antociânicos, sendo o principal composto o ácido rosmarínico; e as outras treze moléculas foram identificadas como compostos antociânicos, sendo a cianidina-3-(6,6'-di-*p*-cumaroil)-soforósido-5-glucósido o composto maioritário.

Quanto à avaliação das bioatividades, estas foram realizadas através do potencial antioxidante, antimicrobiano e citotóxico. O extrato hidroetanólico revelou ter capacidade antioxidante, bem como atividade antimicrobiana, o que pode estar relacionado com a presença de tocoferóis, ácidos gordos polinsaturados, compostos fenólicos e outros ácidos orgânicos existentes na composição da planta. No entanto, este extrato não revelou ação anti-proliferativa nas linhas celulares tumorais testadas, no entanto o manjeriço vermelho rubi não revelou toxicidade perante a cultura de células primárias não-tumorais (PLP2).

Relativamente à obtenção do extrato corante rico em antocianinas, neste trabalho utilizou-se um método rápido para extrair este tipo de compostos das folhas de manjeriço vermelho rubi. Foram empregues com sucesso uma MSR e outras estratégias matemáticas de forma a otimizar as condições de extração, para produzir um extrato rico em compostos corantes (antocianinas) para futura aplicação industrial. Os resultados experimentais e teóricos revelaram que as folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens* são uma fonte interessante de antocianinas, sendo que, a maximização da sua extração é atingida quando são aplicadas temperaturas e concentrações de etanol elevadas, assim como tempos de extração intermédios. A análise da cor do extrato corante revelou valores interessantes, demonstrado que o extrato tem tons escuros e mais direcionados para uma tonalidade vermelha. Ficou, também, evidente que o extrato corante apresenta melhor perfil bioativo, com exceção da atividade antioxidante, comparativamente ao extrato hidroetanólico.

Estes resultados promovem o interesse na realização de mais estudos sobre as variedades *O. basilicum*, destacando o potencial do manjeriço vermelho rubi como uma fonte de ingredientes naturais e bioativos com aplicação na indústria tanto alimentar como farmacêutica.

Assim, como perspectivas futuras, seria interessante estudar a incorporação do extrato corante em matrizes alimentares, comprovando o seu poder corante e a estabilidade do mesmo, bem como a influência dos compostos antociânicos, presentes nas folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*, na composição dessas matrizes alimentares.

6. Referências bibliográficas

Referências bibliográficas

- Abdel-Aal, E.S.M., Hucl, P., & Rabalski, I. (2018). Compositional and antioxidant properties of anthocyanin-rich products prepared from purple wheat. *Food Chemistry*, *254*, 13–19.
- Abreu, R.M.V., Ferreira, I.C.F.R., Calhella, R.C., Lima, R.T., Vasconcelos, M.H., Adegá, F., Chaves, R., & Queiroz, M.J.R.P. (2011). Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-b]pyridine-2-carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *46*, 5800–5806.
- Ahmad, K., Khalil, A. talha, Yusra, & Somayya, R. (2016). Antifungal, phytotoxic and hemagglutination activity of methanolic extracts of *Ocimum basilicum*. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, *36*, 794–798.
- 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.
- Alexandre, E.M.C., Araújo, P., Duarte, M.F., de Freitas, V., Pintado, M., & Saraiva, J.A. (2017a). Experimental design, modeling, and optimization of high-pressure-assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate peel. *Food and Bioprocess Technology*, *10*(5), 886–900.
- Alexandre, E.M.C., Araújo, P., Duarte, M.F., de Freitas, V., Pintado, M., & Saraiva, J. A. (2017b). High-pressure assisted extraction of bioactive compounds from industrial fermented fig by-product. *Journal of Food Science and Technology*, *54*(8), 2519–2531.
- Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J.A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, *84*, 551–562.
- Ananga, A., Georgiev, V., Ochieng, J., Phills, B., & Tsolov, V. (2013). Production of Anthocyanins in Grape Cell Cultures: A Potential Source of Raw Material for

- Pharmaceutical, Food, and Cosmetic Industries. *The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive*, 247–287.
- Angumeenal, A.R., & Venkappayya, D. (2013). An overview of citric acid production. *LWT - Food Science and Technology*, 50, 367-370.
- AOAC, 2016. AOAC Official Methods of Analysis, 20th Editi. ed. AOAC INTERNATIONAL
- Appelhagen, I., Wulff-Vester, A.K., Wendell, M., Hvoslef-Eide, A.K., Russell, J., Oertel, A., Martens, S., Mock, H.P., Martin, C., & Matros, A. (2018). Colour bio-factories: Towards scale-up production of anthocyanins in plant cell cultures. *Metabolic Engineering*, 48, 218–232.
- Arroyo-Maya, I.J., Campos-Terán, J., Hernández-Arana, A., & McClements, D.J. (2016). Characterization of flavonoid-protein interactions using fluorescence spectroscopy: Binding of pelargonidin to dairy proteins. *Food Chemistry*, 213, 431–439.
- Azzi, A. (2017). Many tocopherols, one vitamin E. *Molecular Aspects of Medicine*, 61, 92–103.
- Backes, E., Pereira, C., Barros, L., Prieto, M.A., Genena, A.K., Barreiro, M.F., & Ferreira, I.C.F.R. (2018). Recovery of bioactive anthocyanin pigments from *Ficus carica* L. peel by heat, microwave, and ultrasound based extraction techniques. *Food Research International*, 113, 197–209.
- Baldirim, J.L., Fernandes Silveira, J.G., Almeida, A.P., Carvalho, P.L.N., Rosa, W., Schripsema, J., Chagas-Paula, D.A., Soares, M.G., & Luiz, J. H. H. (2018). The synergistic effects of volatile constituents of *Ocimum basilicum* against foodborne pathogens. *Industrial Crops and Products*, 112, 821–829.
- Bakry, A.M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M.Y., Mousa, A., & Liang, L. (2016). Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 143–182.
- Barros, L., Carvalho, A.M., Morais, J.S., & Ferreira, I.C.F.R. (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*, 120, 247–254.
- Barros, L., Pereira, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2013a). Optimized Analysis of Organic

- Acids in Edible Mushrooms from Portugal by Ultra Fast Liquid Chromatography and Photodiode Array Detection. *Food Analytical Methods*, 6, 309–316.
- Barros, L., Pereira, E., Calhella, R.C., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2013b). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5, 1732–1740
- Berker, K. I., Güçlü, K., Tor, I., & Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72, 1157–1165.
- Bhatti, H.A., Tehseen, Y., Maryam, K., Uroos, M., Siddiqui, B.S., Hameed, A., & Iqbal, J. (2017). Identification of new potent inhibitor of aldose reductase from *Ocimum basilicum*. *Bioorganic Chemistry*, 75, 62–70.
- Braga, A.R.C., Murador, D.C., de Souza Mesquita, L.M., & de Rosso, V.V. (2018). Bioavailability of anthocyanins: Gaps in knowledge, challenges and future research. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 31-40.
- Bubalo, M.C., Čurko, N., Tomašević, M., Ganić, K.K., & Redovniković, I.R. (2016). Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 200, 159–166.
- Buvé, C., Kebede, B.T., De Batselier, C., Carrillo, C., Pham, H.T.T., Hendrickx, M., Grauwet, T., & Van Loey, A. (2018). Kinetics of colour changes in pasteurised strawberry juice during storage. *Journal of Food Engineering*, 216, 42–51.
- Canuto, G.A.B., Oliveira, D.R., da Conceição, L.S.M., Farah, J.P.S., & Tavares, M.F.M. (2016). Development and validation of a liquid chromatography method for anthocyanins in strawberry (*Fragaria spp.*) and complementary studies on stability, kinetics and antioxidant power. *Food Chemistry*, 192, 566–574.
- Carocho, M., Barreiro, M.F., Morales, P., & Ferreira, I.C.F.R. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 377–399.
- Carocho, M., Barros, L., Barreira, J.C.M., Calhella, R.C., Soković, M., Fernández-Ruiz, V., Buelga, C.S., Morales, P., & Ferreira, I.C.F.R. (2016). Basil as functional and

- preserving ingredient in “serra da Estrela” cheese. *Food Chemistry*, 207, 51–59.
- Carocho, M., Barros, L., Calhella, R.C., Ćirić, A., Soković, M., Santos-Buelga, C., Morales, P., & Ferreira, I.C.F.R. (2015a). *Melissa officinalis* L. decoctions as functional beverages: a bioactive approach and chemical characterization. *Food Funct.*, 6, 2240–2248.
- Carocho, M., & Ferreira, I.C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I.C.F.R. (2015b). Natural food additives: *Quo vadis?* *Trends in Food Science & Technology*, 45, 284–295.
- Carod Artal, F.J. (2014). Adverse Neurological Effects Caused by the Ingestion of Plants, Seeds, and Fruits. *Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease: Prevention and Therapy* (pp. 215–219).
- Cefola, M., & Pace, B. (2015). Application of Oxalic Acid to Preserve the Overall Quality of Rocket and Baby Spinach Leaves during Storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39, 2523–2532.
- 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.
- Codex Alimentarius, C. (1995). General standard for food additives. *Codex Standard*, 192, 1–48.
- Cortez, R., Luna-Vital, D.A., Margulis, D., & Gonzalez de Mejia, E. (2017). Natural Pigments: Stabilization Methods of Anthocyanins for Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16, 180–198.
- da Silva, F.J., Nascimento, A.B., Barbosa, L.N., & Magalhães, H.M. (2017). *In vitro* cultivation of purple basil *Ocimum basilicum* L. ‘red rubin’ at different levels of salts, charcoal, sucrose and potassium iodine. *Australian Journal of Crop Science*, 11, 1137-1145.
- da Silva, V.A. (2015). *Atividades antimicrobiana, citotóxico e genotóxico do óleo essencial de Ocimum basilicum (Lamiaceae) e do linolol*. Tese de Pós-Graduação

- em Produtos Naturais e Sintéticos Biológicos. Universidade Federal da Paraíba.
- Dai, Z., Zhou, H., Zhang, S., Gu, H., Yang, Q., Zhang, W., Dong, W., Ma, J., Fang, Y., Jiang, M., & Xin, F. (2018). Current advance in biological production of malic acid using wild type and metabolic engineered strains. *Bioresource Technology*, 258, 345-353.
- Das Gupta, S., & Suh, N. (2016). Tocopherols in cancer: An update. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60, 1354-1363.
- El-Hadidy, E.M.G., & Mostafa, O.F.A (2011). Phytochemical Evaluation of Two Cultivated Basil (*Ocimum basilicum* L.) Green and Red rubin leaves. *Egyptian Journal of Agricultural Research*, 87, 203-215.
- El-Ziat, R.A., Swaefy, H.M., & Esmail, S.E.A. (2018). The Response of Red Rubin Basil Plant to Organic Fertilizer and Humic Acid versus Chemical Fertilizers. *Middle East Journal of Agriculture*, 7, 740-751.
- Espada-Bellido, E., Ferreira-González, M., Carrera, C., Palma, M., Barroso, C.G., & Barbero, G.F. (2017). Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. *Food Chemistry*, 219, 23–32.
- Fernandes, Â., Barreira, J.C.M., Barros, L., Mendonça, Á., Ferreira, I.C.F.R., & Ruivo de Sousa, F. (2018). Chemical and physicochemical changes in Serrana goat cheese submitted to extra-long ripening periods. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 33–39.
- Fernandes, I., Faria, A., Calhau, C., de Freitas, V., & Mateus, N. (2014). Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Functional Foods*, 7, 54–66.
- Ferreira, I.C.F.R., Queiroz, M.J.R.P., Vilas-Boas, M., Estevinho, L.M., Begouin, A., & Kirsch, G. (2006). Evaluation of the antioxidant properties of diarylamines in the benzo[b]thiophene series by free radical scavenging activity and reducing power. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 16, 1384–1387.
- Flanigan, P.M., & Niemeyer, E.D. (2014). Effect of cultivar on phenolic levels, anthocyanin composition, and antioxidant properties in purple basil (*Ocimum basilicum* L.). *Food Chemistry*, 164, 518–526.
- Flores, F.P., Singh, R.K., & Kong, F. (2016). Anthocyanin extraction,

- microencapsulation, and release properties during in vitro digestion. *Food Reviews International*, 32, 46–67.
- Gao, Y., Wang, M., Yang, X., Sun, Q., & Zhao, J. (2014). Rapid detection of quinoline yellow in soft drinks using polypyrrole/single-walled carbon nanotubes composites modified glass carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 735, 84–89.
- Garcia-Mendoza, M. del P., Espinosa-Pardo, F.A., Baseggio, A.M., Barbero, G.F., Maróstica Junior, M.R., Rostagno, M.A., & Martínez, J. (2017). Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis* Mart.) residues using pressurized liquids and supercritical fluids. *The Journal of Supercritical Fluids*, 119, 9–16.
- Garofulić, I.E., Dragović-Uzelac, V., Jambrak, A.R., & Jukić, M. (2013). The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca). *Journal of Food Engineering*, 117, 437–442.
- Ge, L., Zhu, M., Li, X., Xu, Y., Ma, X., Shi, R., Li, D., & Mu, C. (2018). Development of active rosmarinic acid-gelatin biodegradable films with antioxidant and long-term antibacterial activities. *Food Hydrocolloids*, 83, 308–316.
- Gerardi, C., Tommasi, N., Albano, C., Blando, F., Rescio, L., Pinthus, E., & Mita, G. (2015). *Prunus mahaleb* L. fruit extracts: a novel source for natural food pigments. *European Food Research and Technology*, 241, 683–695.
- Germinario, G., Rigante, E.C.L., van der Werf, I.D., & Sabbatini, L. (2017). Pyrolysis gas chromatography–mass spectrometry of triarylmethane dyes. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 127, 229–239.
- Ghazali, E., Soon, P.C., Mutum, D.S., & Nguyen, B. (2017). Health and cosmetics: Investigating consumers' values for buying organic personal care products. *Journal of Retailing and Consumer Services*, 39, 154–163.
- Gómez-Coronado, D.J.M., Ibañez, E., Rupérez, F.J., & Barbas, C. (2004). Tocopherol measurement in edible products of vegetable origin. *Journal of Chromatography A*, 1054, 227–233.
- Gowd, V., Jia, Z., & Chen, W. (2017). Anthocyanins as promising molecules and dietary

- bioactive components against diabetes – A review of recent advances. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 1–13.
- Haraguchi, L.M., & Carvalho, O.B.de. (2010). *Divisão Técnica Escola Municipal de Jardinagem*.
- Harasym, J., & Bogacz-Radomska, L. (2016). COLORANTS IN FOODS - FROM PAST TO PRESENT. *Engineering Sciences & Technologies / Nauki Inzynierskie i Technologie*, 3, 21–35.
- 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 Bioprocess Processing*, 100, 25–35.
- 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- α -stimulated vascular smooth muscle cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 96, 563–571.
- Jardim Botânico UTAD | *Ocimum basilicum* L. (n.d.). Retrieved January 23, 2018, from https://jb.utad.pt/especie/Ocimum_basilicum
- 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.
- Jornal Oficial da União Europeia. (2011). Regulamento (UE) N°1129/2011. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 25.
- Jun, X. (2009). Caffeine extraction from green tea leaves assisted by high pressure processing. *Journal of Food Engineering*, 94(1), 105–109.
- Kadan, S., Saad, B., Sasson, Y., & Zaid, H. (2016). *In vitro* evaluation of anti-diabetic activity and cytotoxicity of chemically analysed *Ocimum basilicum* extracts. *Food Chemistry*, 196, 1066–1074.
- Kang, Y.R., Park, J., Jung, S.K., & Chang, Y.H. (2018). Synthesis, characterization, and functional properties of chlorophylls, pheophytins, and Zn-pheophytins. *Food Chemistry*, 245, 943–950.

- Karunaratne, D.N., & Pamunuwa, G.K. (2017). Introductory Chapter: Introduction to Food Additives. *Food Additives* (pp. 3–17).
- Kayashima, T., & Katayama, T. (2002). Oxalic acid is available as a natural antioxidant in some systems. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1573*, 1–3.
- Khan, M. Z., & He, L. (2017). The role of polyunsaturated fatty acids and GPR40 receptor in brain. *Neuropharmacology*, *113*, 639-651.
- Khoo, H.E., Azlan, A., Tang, S.T., & Lim, S.M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, *61*, 1361779.
- Kim, K.B., Nam, Y.A., Kim, H.S., Hayes, A.W., & Lee, B.M. (2014). α -Linolenic acid: Nutraceutical, pharmacological and toxicological evaluation. *Food and Chemical Toxicology*, *70*, 163–178.
- Kraic, J., Mihálik, D., Klčová, L., Gubišová, M., Klemková, T., Hudcovicová, M., Ondreičková, K., Mrkvová, M., Havrlentová, M., Gubiš, J., & Čertík, M. (2018). Progress in the genetic engineering of cereals to produce essential polyunsaturated fatty acids. *Journal of Biotechnology*, *284*, 115–122.
- Kwee, E.M., & Niemeyer, E.D. (2011). Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, *128*, 1044-1050.
- Lee, J., & Scagel, C.F. (2009). Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Food Chemistry*, *115*, 650–656.
- Leleu, C., Boulitrop, C., Bel, B., Jeudy, G., Vabres, P., & Collet, E. (2013). Quinoline Yellow dye-induced fixed food-and-drug eruption. *Contact Dermatitis*, *68*, 187–188.
- Li, Y., Wei, H., & Liu, R. (2014). A probe to study the toxic interaction of tartrazine with bovine hemoglobin at the molecular level. *Luminescence*, *29*, 195–200.
- Lima, R., Turrini, R., Silva, L.R., Melo, L., & Augusto, S.I. (2017). Popular healing practices and medical plants use for riparian mothers in early childhood care. *Revista de Pesquisa: Cuidado é Fundamental Online*, *9*, 1154.
- 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.
- Lipskikh, O.I., Korotkova, E.I., Khristunova, Y.P., Barek, J., & Kratochvil, B. (2017). Sensors for voltammetric determination of food azo dyes - A critical review. *Electrochimica Acta*, 260, 974–985.
- López, C. J., Caleja, C., Prieto, M. A., Barreiro, M. F., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Optimization and comparison of heat and ultrasound assisted extraction techniques to obtain anthocyanin compounds from *Arbutus unedo* L. Fruits. *Food Chemistry*, 264, 81–91.
- Lucová, M., Hojerová, J., Pažoureková, S., & Klimová, Z. (2013). Absorption of triphenylmethane dyes Brilliant Blue and Patent Blue through intact skin, shaven skin and lingual mucosa from daily life products. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 19–27.
- Luna, M.C., Bekhradi, F., Ferreres, F., Jordán, M.J., Delshad, M., & Gil, M.I. (2015). Effect of Water Stress and Storage Time on Anthocyanins and Other Phenolics of Different Genotypes of Fresh Sweet Basil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 9223–9231.
- Luna-Vital, D., Li, Q., West, L., West, M., & Gonzalez de Mejia, E. (2017). Anthocyanin condensed forms do not affect color or chemical stability of purple corn pericarp extracts stored under different pHs. *Food Chemistry*, 232, 639–647.
- Machado, A.P.D.F., Pasquel-Reátegui, J.L., Barbero, G.F., & Martínez, J. (2015). Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. *Food Research International*, 77, 675–683.
- Mangetti, M.C., Affini, R.P., Bernardi, A.C. de A., Lunardi, N., De Oliveira, G.J.P.L., Noeck Neto, R.J., & Boeck, E.M. (2017). In situ evaluation of basil oil essential oil cytotoxicity (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Research in Dentistry*, 5, 16.
- Martin, F., Oberson, J.M., Meschiari, M., & Munari, C. (2016). Determination of 18 water-soluble artificial dyes by LC-MS in selected matrices. *Food Chemistry*, 197, 1249–1255.

- Martín, J., Kuskoski, E.M., Navas, M.J., & Asuero, A. G. (2017a). Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health* (pp. 205-255).
- Martín, J., Navas, M.J., Jiménez-Moreno, A.M., & Asuero, A.G. (2017b). Anthocyanin Pigments: Importance, Sample Preparation and Extraction. *Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications* (pp. 117-152).
- Martins, N., Roriz, C.L., Morales, P., Barros, L., & Ferreira, I.C.F.R. (2016). Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science and Technology*, 52, 1–15.
- Matejczyk, M., Świsłocka, R., Golonko, A., Lewandowski, W., & Hawrylik, E. (2018). Cytotoxic, genotoxic and antimicrobial activity of caffeic and rosmarinic acids and their lithium, sodium and potassium salts as potential anticancer compounds. *Advances in Medical Sciences*, 63, 14–21.
- McCance, K.R., Flanigan, P.M., Quick, M.M., & Niemeyer, E.D. (2016). Influence of plant maturity on anthocyanin concentrations, phenolic composition, and antioxidant properties of 3 purple basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 53, 30–39.
- Moghaddam, M., & Mehdizadeh, L. (2015). Variability of total phenolic, flavonoid and rosmarinic acid content among Iranian basil accessions. *LWT - Food Science and Technology*, 63, 535–540.
- Moon, J.K., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1655-1666.
- Murado García, M. A., & Prieto Lage, M. Á. (2013). Dose-Response Analysis in the Joint Action of Two Effectors. A New Approach to Simulation, Identification and Modelling of Some Basic Interactions. *PLoS ONE*, 8(4), e61391.
- Murillo-Amador, B., Nieto-Garibay, A., Troyo-Diéguez, E., Flores-Hernández, A., Cordoba-Matson, M.V., & Villegas-Espinoza, A (2013). Proximate analysis among 24 *Ocimum* cultivars under two cultivation environments: A comparative study. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 11, 2842-2848.
- Nagoba, B., Davane, M., Gandhi, R., Wadher, B., Suryawanshi, N., & Selkar, S. (2017).

- Treatment of skin and soft tissue infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*—A review of our experiences with citric acid over the past 20 years. *Wound Medicine*, *19*, 5-9.
- Nanetti, A., Rodriguez-García, C., Meana, A., Martín-Hernández, R., & Higes, M. (2015). Effect of oxalic acid on *Nosema ceranae* infection. *Research in Veterinary Science*, *102*, 167–172.
- Nayak, D.S., & Shetti, N. P. (2016). A novel sensor for a food dye erythrosine at glucose modified electrode. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, *230*, 140–148.
- Newsome, A.G., Culver, C.A., & Van Breemen, R.B. (2014). Nature's palette: The search for natural blue colorants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*, 498–6511.
- Ongkowijoyo, P., Luna-Vital, D.A., & Gonzalez de Mejia, E. (2018). Extraction techniques and analysis of anthocyanins from food sources by mass spectrometry: An update. *Food Chemistry*, *250*, 113-126.
- Osaili, T.M., Al-Nabulsi, A.A., Jaradat, Z., Shaker, R.R., Alomari, D.Z., Al-Dabbas, M.M., Alaboudi, A.R., Al-Natour, M.Q., & Holley, R.A. (2015). Survival and growth of *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in eggplant dip during storage. *International Journal of Food Microbiology*, *198*, 37–42.
- Overview of Food Ingredients, Additives & Colors*. (n.d.). Consultado a 4 de Janeiro de 2018, de Food and Drug Administration of the United States of America, "FDA". Disponível em <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm094211.htm#foodadd>.
- Paes, J., Dotta, R., Barbero, G.F., & Martínez, J. (2014). Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂ and pressurized liquids. *The Journal of Supercritical Fluids*, *95*, 8–16.
- Pereira, C., Barros, L., & Ferreira, I.C.F.R. (2015a). A Comparison of the Nutritional Contribution of Thirty-nine Aromatic Plants used as Condiments and/or Herbal Infusions. *Plant Foods for Human Nutrition*, *70*, 176–183.

- Pereira, E., Pimenta, A.I., Calhella, R.C., Antonio, A.L., Cabo-Verde, S., Barros, L., Santos-Buelga, C. & Ferreira, I.C.F.R. (2016). Effects of gamma irradiation on cytotoxicity and phenolic compounds of *Thymus vulgaris* L. and *Mentha x piperita* L.. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 370-377.
- Pereira, E., Antonio, A.L., Barreira, J.C.M., Barros, L., Bento, A., & Ferreira, I.C.F.R. (2015b). Gamma irradiation as a practical alternative to preserve the chemical and bioactive wholesomeness of widely used aromatic plants. *Food Research International*, 67, 338–348.
- Pereira, P.C.G., Reimão, R.V., Pavesi, T., Saggiaro, E.M., Moreira, J.C., & Veríssimo Correia, F. (2017). Lethal and sub-lethal evaluation of Indigo Carmine dye and byproducts after TiO₂ photocatalysis in the immune system of *Eisenia andrei* earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 143, 275–282.
- Pérez-Ibarbia, L., Majdanski, T., Schubert, S., Windhab, N., & Schubert, U.S. (2016). Safety and regulatory review of dyes commonly used as excipients in pharmaceutical and nutraceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93, 264-273.
- Phippen, W.B., & Simon, J.E. (1998). Anthocyanins in Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1734–1738.
- Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A.M., & Ferreira, I.C.F.R. (2011). Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteeae (Fabaceae). *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2983–2989.
- Polturak, G., & Aharoni, A. (2017). “La Vie en Rose”: Biosynthesis, sources and applications of betalain pigments. *Molecular Plant*, 11, 7–22.
- Prieto, M.A., Curran, T.P., Gowen, A., & Vázquez, J.A. (2015). An efficient methodology for quantification of synergy and antagonism in single electron transfer antioxidant assays. *Food Research International*, 67, 284–298.
- Prieto, M. A., & Vázquez, J. A. (2014). In vitro determination of the lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of unroasted coffee bean extracts and their synergistic and antagonistic effects. *Food Research International*, 62(10), 1183–1196.

- Ranic, M., Nikolic, M., Pavlovic, M., Buntic, A., Siler-Marinkovic, S., & Dimitrijevic-Brankovic, S. (2014). Optimization of microwave-assisted extraction of natural antioxidants from spent espresso coffee grounds by response surface methodology. *Journal of Cleaner Production*, 80, 69–79.
- Reiter, E., Jiang, Q., & Christen, S. (2007). Anti-inflammatory properties of α - and γ -tocopherol. *Molecular Aspects of Medicine*, 28, 668-691.
- Rocha, J.C.G., Procópio, F.R., Mendonça, A.C., Vieira, L.M., Perrone, Í.T., de Barros, F.A.R., & Stringheta, P.C. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from jussara (*Euterpe edulis* M.) and blueberry (*Vaccinium myrtillus*) fruits. *Food Science and Technology*, 38, 45–53.
- Rodriguez-Amaya, D.B. (2016). Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science*, 7, 20-26.
- 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.
- Saini, R.K., & Keum, Y.S. (2016). Tocopherols and tocotrienols in plants and their products: A review on methods of extraction, chromatographic separation, and detection. *Food Research International*, 82, 59–70.
- Sarikaya, R., Selvi, M., & Erkoç, F. (2012). Evaluation of potential genotoxicity of five food dyes using the somatic mutation and recombination test. *Chemosphere*, 88, 974–979.
- Segurança Alimentar - Aditivos Alimentares*. (n.d.). Consultado a 10 de Janeiro de 2018, de Autoridade e Segurança Alimentar e Económica. Disponível em <http://www.asae.gov.pt/pagina.aspx?f=1&back=1&codigono=5960596361426144AAAAAAA>
- Shahid, M., Shahid-UI-Islam, & Mohammad, F. (2013). Recent advancements in natural dye applications: A review. *Journal of Cleaner Production*, 53, 310-331.
- Sigurdson, G.T., Tang, P., & Giusti, M.M. (2017). Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8, 261–280.
- Srivastava, S., Adholeya, A., Conlan, X.A., & Cahill, D.M. (2016). Acidic Potassium

- Permanganate Chemiluminescence for the Determination of Antioxidant Potential in Three Cultivars of *Ocimum basilicum*. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71, 72–80.
- Srivastava, S., Cahill, D.M., Conlan, X.A., & Adholeya, A. (2014). A Novel *in Vitro* Whole Plant System for Analysis of Polyphenolics and Their Antioxidant Potential in Cultivars of *Ocimum basilicum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 10064–10075.
- Steiner, A.D., Vargas, A., Fronza, N., Brandelli, A., & dos Santos, J.H.Z. (2017). Antimicrobial activity of some natural extracts encapsulated within silica matrices. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 160, 177–183.
- Sun, X.-h., Zhou, T.-t., Wei, C.-h., Lan, W.-q., Zhao, Y., Pan, Y.-j., & Wu, V.C.H. (2018). Antibacterial effect and mechanism of anthocyanin rich Chinese wild blueberry extract on various foodborne pathogens. *Food Control*, 94, 155–161
- Swier, T.L., Chauhan, K., Paul, P.K., & Mukhim, C. (2016). Evaluation of enzyme treatment conditions on extraction of anthocyanins from *Prunus nepalensis* L. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 867–871.
- Szymanowska, U., Złotek, U., Karaś, M., & Baraniak, B. (2015). Anti-inflammatory and antioxidative activity of anthocyanins from purple basil leaves induced by selected abiotic elicitors. *Food Chemistry*, 172, 71–77.
- Takwa, S., Caleja, C., Barreira, J.C.M., Soković, M., Achour, L., Barros, L., & Ferreira, I.C.F.R. (2018). *Arbutus unedo* L. and *Ocimum basilicum* L. as sources of natural preservatives for food industry: A case study using loaf bread. *LWT - Food Science and Technology*, 88, 47–55.
- Teng, H., Fang, T., Lin, Q., Song, H., Liu, B., & Chen, L. (2017). Red raspberry and its anthocyanins: Bioactivity beyond antioxidant capacity. *Trends in Food Science & Technology*, 66, 153–165.
- Teofilović, B., Grujić-Letić, N., Goločorbin-Kon, S., Stojanović, S., Vastag, G., & Gadžurić, S. (2017). Experimental and chemometric study of antioxidant capacity of basil (*Ocimum basilicum*) extracts. *Industrial Crops and Products*, 100, 176–182.
- Varga, F., Carović-Stanko, K., Ristić, M., Grdiša, M., Liber, Z., & Šatović, Z. (2017). Morphological and biochemical intraspecific characterization of *Ocimum basilicum*

- L. *Industrial Crops and Products*, 109, 611–618.
- Venancio, A. M. (2006). *Toxicidade aguda e atividade antinociceptiva do óleo essencial do Ocimum basilicum l. (manjeriçã), em Mus musculus (camundongos)*. Tese de Mestrado em ciências da saúde. Universidade Federal de Sergipe.
- Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006) Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1, 1112-1116.
- Vieira, P.R.N., de Moraes, S.M., Bezerra, F.H.Q., Ferreira, P.A.T., Oliveira, Í.R., & Silva, M.G.V. (2014). Chemical composition and antifungal activity of essential oils from *Ocimum* species. *Industrial Crops and Products*, 55, 267-271.
- Vieira, V., Prieto, M.A., Barros, L., Coutinho, J.A.P., Ferreira, O., & Ferreira, I.C.F.R. (2017). Optimization and comparison of maceration and microwave extraction systems for the production of phenolic compounds from *Juglans regia* L. for the valorization of walnut leaves. *Industrial Crops and Products*, 107, 341–352.
- Wang, M., Cui, M., Zhao, M., & Cao, H. (2018). Sensitive determination of Amaranth in foods using graphene nanomeshes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 809, 117–124.
- 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.
- 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 and 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.
- Yang, R., Liu, S., Zheng, Y., Zhang, M., Dang, R., & Tang, M. (2018). Maternal diet of polyunsaturated fatty acid influence the physical and neurobehaviour of rat offspring. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 71, 156–162.
- Yopp, J.H., Lambers, H., Schmid, R., Woodwell, G.M., Rothwell, G.W., & Dickison, W.C. (2018). *Plant – Biology*. Encyclopedia Britannica.
- Zhou, L., Wang, H., Yi, J., Yang, B., Li, M., He, D., Yang, W., Zhang, Y., Ni, H. (2018).

Anti-tumor properties of anthocyanins from *Lonicera caerulea* ‘Beilei’ fruit on human hepatocellular carcinoma: *In vitro* and *in vivo* study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *104*, 520–529.

Złotek, U., Szymanowska, U., Karaś, M., & Świeca, M. (2015). Antioxidative and anti-inflammatory potential of phenolics from purple basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves induced by jasmonic, arachidonic and β -aminobutyric acid elicitation. *International Journal of Food Science and Technology*, *51*, 163–170.