

Valorização de ingredientes naturais na inclusão de uma dieta saudável

Sandra Andreia Gonçalves Marcelino

*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*

Orientada por:

Doutora Lillian Barros

Doutora Sandrina Heleno

Bragança

2021

AGRADECIMENTOS

No decorrer deste ano de trabalho que agora termina quero agradecer a todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram para esta longa aprendizagem, sem as quais este trabalho não teria sido possível. De modo particular gostaria de agradecer:

Ao **Instituto Politécnico de Bragança**, na pessoa do Presidente Orlando Isidoro Afonso Rodrigues, e os seus fantásticos docentes que permitem uma educação de qualidade e crescimento pessoal e académico constante.

À **Universidade de Salamanca** que possibilitou uma experiência nova e diferente numa universidade de renome, e que nos fez sentir em casa, estando sempre disponíveis para os seus alunos transfronteiriços.

Ao **Centro de Investigação de Montanha (CIMO)**, por me ter dado a oportunidade de integrar a sua equipa e poder desenvolver o meu trabalho.

À **Professora Doutora Isabel C.F.R. Ferreira**, e à **Doutora Lillian Barros**, por me terem incentivado em voltar à vida académica, por todo o apoio, disponibilidade e simpatia que sempre me dedicaram desde o início desta caminhada.

À **Doutora Sandrina Heleno**, pela sua orientação, apoio e dedicação incansável para eu poder atingir este meu objetivo.

À **Ângela Liberal** pela ajuda e orientação nas horas de trabalho nos laboratórios do CIMO, por me apoiar e incentivar a todo o momento, por me fazer sentir capaz de escrever e acabar este trabalho.

À **minha família**, pai, mãe e irmã, por sempre acreditarem de que eu sou capaz de realizar tudo a que me propuser. Aos meus filhos, que nunca me deixaram só.. e muito menos durante a escrita deste trabalho.

RESUMO

Os consumidores, conscientes da utilização generalizada de aditivos artificiais, procuram cada vez mais por uma alimentação mais natural e, portanto, mais saudável. Esta mudança de comportamento está a forçar a indústria a responder a estes novos desafios, estando a indústria alimentar a trabalhar arduamente para se adaptar melhor a esta nova realidade.

Neste trabalho foram usados três corantes de origem natural, um pigmento extraído de *Amaranthus Caudatus L.*, a curcumina e paprica. Estes corantes foram incorporados em três produtos alimentares: cheesecake, gelado e manteiga. Os efeitos da incorporação destes corantes naturais foram avaliados através da análise dos parâmetros físicos em fresco (cor, pH, atividade da água e humidade), assim como pela sua composição centesimal, ao longo do tempo de prateleira de cada um dos alimentos. Globalmente, estes corantes naturais mostraram ter poder corante suficiente para cumprirem o seu propósito, sendo que o extrato de *Amaranthus caudatus L.*, apresenta maior poder corante. Demonstraram também não alterar significativamente a composição nutricional das amostras, sendo por isso uma alternativa interessante pois espera-se que a utilização de corantes, sejam eles naturais ou artificiais, não afetem a composição do alimento em questão, tendo se verificado ligeiras alterações nas formulações de manteiga.

Para verificar a aceitação por parte dos consumidores de alimentos corados com diferentes corantes alimentares foi lhes pedido para preencher um questionário depois da prova de amostras, e foi realizado à posteriori o estudo e o tratamento estatístico dos dados. Foi possível verificar que mais de 61% compraria um dos produtos corados com os corantes naturais em estudo, e que a cor laranja (atribuída à paprica) destaca-se pela persistência do sabor e pelo seu odor mais intenso nos três tipos de alimentos analisados.

Em conclusão, estes corantes alimentares, foram estudados em três amostras alimentares de base láctea, tendo revelado potencial de aplicação na indústria alimentar devido à elevada estabilidade observada ao longo do tempo de prateleira destes alimentos, abrindo-se assim a oportunidade para o estudo mais aprofundado sobre a estabilidade destes ingredientes quando aplicados noutros produtos alimentares.

Palavras-chave: *Amaranthus Caudatus L.*, *Capsicum annuum L.*, *Curcuma longa L.*, corantes naturais, composição nutricional, avaliação sensorial.

ABSTRACT

Consumers, aware of the widespread use of artificial additives, are increasingly looking for a more natural, and therefore healthier diet. This change in behavior is forcing the industry to respond to these new challenges and the food industry is working hard to better adapt to this new reality.

In this work, three colours of natural origin were used, a pigment extracted from *Amaranthus Caudatus* L., curcumin and paprika. These colours were incorporated into three food products: cheesecake, ice cream and butter. The effects of the incorporation of these natural colours were evaluated by the analysis of physical parameters in fresh product (colour, pH, water activity and humidity), as well as by their centesimal composition, throughout the shelf life of each of the foods. Globally, these natural colourings showed to have sufficient colouring power to fulfil their purpose, being that the extract of *Amaranthus caudatus* L., presents a higher colouring power. They also proved not to significantly alter the nutritional composition of the samples, being therefore an interesting alternative, since it is expected that the use of colorants, whether natural or artificial, does not affect the composition of the food in question, having been verified slight alterations in the butter formulations.

To verify consumer acceptance of foods coloured with different food colours, they were asked to fill in a questionnaire after sampling, and the study and statistical treatment of the data was carried out a posteriori. It was possible to verify that more than 61% would buy one of the products coloured with the natural colourings under study, and that the orange colour (attributed to paprika) stands out for its persistence of flavour and its most intense smell in the three types of food analysed.

In conclusion, these food colours were studied in three milk-based food samples, revealing potential application in the food industry due to the high stability observed along the shelf-life of these foods. This opens up the opportunity to further study the stability of these ingredients when applied to other food products.

Keywords: *Amaranthus Caudatus* L., *Capsicum annuum* L., *Curcuma longa* L., natural colourants, nutritional composition, sensory evaluation.

RESUMÉN

Los consumidores conscientes del uso generalizado de aditivos artificiales, buscan cada vez más una dieta más natural y así, más sana. Este cambio de comportamiento está obligando a la industria a responder a estos nuevos retos, y la industria alimentaria está trabajando duro para adaptarse mejor a esta nueva realidad.

En este trabajo se utilizaron tres colores de origen natural, un pigmento extraído de *Amaranthus Caudus* L., la curcumina y el pimentón. Estos colores se incorporaron a tres productos alimenticios: tarta de queso, helado y mantequilla. Los efectos de la incorporación de estos colorantes naturales se evaluaron mediante el análisis de parámetros físicos en fresco (color, pH, actividad de agua y humedad), así como por su composición centesimal, a lo largo de la vida útil de cada uno de los alimentos. Globalmente, estos colorantes naturales demostraron tener un poder colorante suficiente para cumplir su cometido, siendo el extracto de *Amaranthus caudatus* L., el que presenta un mayor poder colorante. También demostraron no alterar significativamente la composición nutricional de las muestras, siendo por tanto una alternativa interesante, ya que se espera que el uso de colorantes, ya sean naturales o artificiales, no afecte a la composición del alimento en cuestión, habiéndose comprobado ligeras alteraciones en las formulaciones de mantequilla.

Para comprobar la aceptación por parte de los consumidores de los alimentos coloreados con diferentes colorantes alimentarios, se les pidió que rellenaran un cuestionario tras la degustación de las muestras, y el estudio y tratamiento estadístico de los datos se realizó a posteriori. Se pudo comprobar que más del 61% compraría uno de los productos coloreados con los colorantes naturales en estudio, y que el color naranja (atribuido al pimentón) destaca por su persistencia de sabor y su olor más intenso en los tres tipos de alimentos analizados.

En conclusión, se estudiaron estos colorantes alimentarios en tres muestras de alimentos a base de leche, revelando su potencial aplicación en la industria alimentaria debido a la alta estabilidad observada a lo largo de la vida útil de estos alimentos, lo que abre la oportunidad de seguir estudiando la estabilidad de estos ingredientes cuando se aplican a otros productos alimentarios.

Palabras-clave: *Amaranthus Caudatus* L., *Capsicum annum* L., *Curcuma longa* L., colorantes naturales, composición nutricional, evaluación sensorial.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO.....	III
ABSTRACT	IV
RESUMÉN	V
Índice de Tabelas	VIII
Índice de figuras.....	X
LISTA de Abreviaturas e símbolos.....	XI
1. Introdução	1
2. Aditivos Alimentares	3
2.1. <i>Corantes naturais</i>	<i>4</i>
2.2. <i>Vantagens e desvantagens dos aditivos naturais</i>	<i>12</i>
2.3. <i>Métodos e fontes de obtenção de compostos naturais.....</i>	<i>14</i>
2.4. <i>Técnicas de extração convencional.....</i>	<i>15</i>
3. Objetivos.....	23
4. Material e Métodos.....	24
4.1. <i>Preparação dos extratos.....</i>	<i>24</i>
4.2. <i>Procedimento de extração.....</i>	<i>24</i>
4.3. <i>Preparação dos produtos alimentares</i>	<i>25</i>
4.5. <i>Análise da composição centesimal.....</i>	<i>29</i>
4.6. <i>Avaliação da aceitação dos consumidores aos produtos desenvolvidos</i>	<i>30</i>
4.7. <i>Análise estatística.....</i>	<i>30</i>
5. Resultado e Discussão.....	32
5.1. <i>“Cheesecake”</i>	<i>33</i>
5.2. <i>Gelados.....</i>	<i>38</i>
5.3. <i>Manteigas</i>	<i>42</i>
5.4. <i>Análise sensorial.....</i>	<i>47</i>
6. Conclusão e perspectivas	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
8. Anexos.....	62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade de corante natural utilizado em cada amostra (mg/100g de produto).	27
Tabela 2. Composição centesimal do cheesecake incorporado com paprica e controlo, expressos em g/100g de massa fresca (mf).	34
Tabela 3. Coordenadas de cor, atividade da água e pH de cheesecake com paprica.....	34
Tabela 4. Composição centesimal do cheesecake incorporado com curcumina, expressos em g/100g de mf.	35
Tabela 5. Coordenadas de cor, atividade da água e pH de cheesecake com curcumina.	35
Tabela 6. Composição centesimal do cheesecake incorporado com <i>Amaranthus caudatus</i> L. expressos em g/100g de mf.	37
Tabela 7. Coordenadas de cor, atividade da água e pH de cheesecake com <i>Amaranthus caudatus</i> L.....	37
Tabela 8. Composição centesimal de gelado incorporado com paprica, expressos em g/100g de mf.	38
Tabela 9. Coordenadas de cor, atividade da água e pH de gelado com paprica.....	39
Tabela 10. Composição centesimal de gelado incorporado com curcumina, expressos em g/100g de mf.	39
Tabela 11. Coordenadas de cor, atividade da água e pH de gelado com curcumina.....	40
Tabela 12. Composição centesimal de gelado incorporado com <i>Amaranthus caudatus</i> L. expresso em g/100g de mf.....	41
Tabela 13. Coordenadas de cor, atividade da água e pH de gelado com <i>Amaranthus caudatus</i> L.....	41
Tabela 14. Composição centesimal de manteigas incorporadas com paprica, expressos em g/100g de mf.	42
Tabela 15. Coordenadas de cor, atividade da água, pH da manteiga com paprica.....	43
Tabela 16. Composição centesimal de manteiga incorporada com curcumina, expressos em g/100g de mf.	45
Tabela 17. Coordenadas de cor, atividade da água e pH da manteiga com curcumina.	46
Tabela 18. Composição centesimal de manteiga incorporada com <i>Amaranthus caudatus</i> L., expressos em g/100g de mf.	46

Tabela 19. Coordenadas de cor, atividade da água e pH da manteiga incorporada com <i>Amaranthus caudatus</i> L.	47
Tabela 22. Preferências na cor, características de sabor, olfativas e aspeto geral.....	48
Tabela 23. Caracterização da amostra.	49
Tabela 24. Comportamento de compra.....	50
Tabela 25. Preferência de cor consoante género	52
Tabela 26. Preferência de cor consoante a idade.....	53
Tabela 27. Avaliação da cor consoante as características organoléticas.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos principais carotenos (I) e xantofilas (II). Adaptado de Ngamwonglumlert et al. 2017.	7
Figura 2. Estrutura das principais antocianinas. Adaptado de Albuquerque et al. 2020. 9	
Figura 3. Estrutura química de flavonas e flavonois. Adaptado de Albuquerque et al. 2020	9
Figura 4. Clorofilas. Adaptado de Albuquerque et al., 2020 (24).	10
Figura 5. Estrutura química de Betacianina (a) e da Betaxantina (b). Adaptado de Albuquerque et al. 2020.....	12
Figura 6. Gelados corados com diferentes corantes naturais.	25
Figura 7. Cheesecake corados com diferentes corantes naturais.....	26
Figura 8. Manteigas coradas com diferentes corantes naturais.	27
Figura 9. Médias marginais estimadas de a^* e b^* para o cheesecake incorporados com curcumina.	36
Figura 10. Médias marginais estimadas de L^* e b^* para a manteiga incorporada com paprica.	44
Figura 11. Sabe o que são aditivos naturais?.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AC – *Amaranthus Caudatus* L.
AOAC - Association of Official Analytical Chemist
AVC – Acidente vascular cerebral
Aw – Atividade da água
BDMC - Bis-demetoxicurcumina
CC – Curcumina
CIE - Commission Internationale de l'Eclairage
DMC - Demetoxi-curcumina
FDA – Food and Drug Administration
FNA – Flavonóides não-antociânicos
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
IBM - International Business Machines
MO – Missouri
NMR – Nuclear Magnetic Resonance
PC – Ponto crítico
RP – Reverse phase
SPSS- “Statistical Package for the Social Sciences”
TA – Tempo de armazenamento
TC – Tipo de corante
TLC- Thin Layer Chromatography
USA – United States of America
UV – Ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

A alimentação é uma necessidade inegável para a humanidade, tendo evoluído fundamentalmente nas últimas duas décadas, desempenhando um papel crucial na manutenção da espécie humana.

Os aditivos alimentares são conhecidos e utilizados desde a antiguidade, datando do tempo dos egípcios (300 a.C.), dado terem sido descobertas nos seus túmulos, figuras representativas de alimentos coloridos, e evidências do uso de corantes artificiais em vinho e produtos similares, tornando-se esta uma prática comum na segunda metade do século XIX (1).

Entendemos instintivamente a palavra “natural” como sendo associada a algo positivo. Neste sentido, os consumidores, conscientes do uso massivo de aditivos artificiais, procuram cada vez mais por alimentos naturais e, portanto, mais saudáveis, através de uma alimentação à base destes produtos em detrimento dos primeiros, impulsionando a indústria a acompanhar estes novos desafios. Esta valorização do corpo e da saúde, “mente sã em corpo sã”, incita a que os consumidores estejam cada vez mais informados e procurem opções que garantam o uso consciente de aditivos naturais na sua alimentação quotidiana (2–5). A substituição de corantes artificiais por outros de origem natural está cada vez mais na ordem do dia (3–7) e, por isso, a indústria alimentar ambiciona por uma melhor adaptação a esta nova realidade impulsionada pelo consumidor, na busca por uma melhoria de bem-estar.

Apesar dos esforços consideráveis na melhoria das tecnologias de produção, nos padrões de higiene e na educação do consumidor, a deterioração causada por microrganismos patogénicos é ainda responsável por enormes perdas económicas e custos humanos inaceitáveis (8). Consequentemente, em resultado do aumento do consumo de alimentos frescos, minimamente processados e prontos para consumo, surgiram novas rotas ecológicas para o crescimento microbiano. Neste campo, de modo a garantir a segurança dos seus alimentos, os consumidores passaram a exigir sistemas de produção de alimentos "mais saudáveis" e mais ecológicos, que promovam o desenvolvimento de soluções inovadoras de bio preservação, baseadas no uso de agentes antimicrobianos naturais em detrimento dos artificiais (9).

Segundo o Codex Alimentar, um aditivo alimentar define-se como: *“Qualquer substância que como tal, não seja normalmente consumida como alimento, nem que se use como ingrediente base em alimentos, tendo ou não valor nutricional, e cuja adição*

intencional ao alimento com fins tecnológicos (incluindo fins organoléticos), em fases de fabricação e processamento, elaboração, preparação, tratamento, embalagem, transporte e armazenamento, seja razoavelmente expectável ou passível de resultar (direta ou indiretamente), por si ou por seus subprodutos, num componente alimentar ou um elemento que afete as suas características”.

Esta definição não inclui “contaminantes” ou substâncias adicionadas aos alimentos para manter ou melhorar a qualidade nutricional (10).

Já a “Food and Drug Administration” (FDA) define aditivo alimentar como: *“Qualquer substância cujo uso pretendido resulte ou possa resultar – direta ou indiretamente num componente ou possa afetar de alguma forma as características de qualquer alimento”* (11).

Durante séculos, os aditivos alimentares foram utilizados para aromatizar, colorir ou ainda preservar/prolongar a vida útil dos alimentos, enquanto que hoje em dia são também imprescindíveis para garantir e promover a segurança alimentar (1,12,13). Todos os dias, toneladas de aditivos são utilizados pela indústria alimentar com essa finalidade (2), podendo estes ser divididos em vários grupos: corantes, conservantes, antioxidantes, emulsionantes, espessantes/gelificantes, estabilizadores, aromatizantes, edulcorantes e outros menos comuns. Os conservantes mais antigos incluíam o dióxido de enxofre (E220), ácido acético (E260) e nitrito de sódio (E250), enquanto a curcuma (E100) e carmim (E120) assumiram-se como os primeiros corantes utilizados.

Alguns aditivos artificiais foram usados durante décadas. No entanto, estudos aprofundados mostraram evidências de efeitos adversos a médio-longo prazo decorrentes da sua utilização, tendo, por isso, sido restrito o seu uso (4). Adicionalmente, existem várias limitações ao uso de aditivos naturais na indústria alimentar, nomeadamente : 1) o facto do preço destes aditivos ser mais elevado quando comparado com os de origem artificial, 2) a eficácia real do aditivo natural, 3) o facto de alguns aditivos naturais serem necessários em quantidades mais elevadas, 4) a falta de legislação sobre aditivos naturais, e 5) o facto de ser por vezes difícil encontrar ou reproduzir as fontes naturais, plantas ou microrganismos, que os produzem (11). Outras limitações são as de ordem técnica, propriedades da extração e de conservação, as quais podem alterar ou pôr em risco a estabilidade destes aditivos, nomeadamente a temperatura, oxigénio, luz, pH, atividade da água, entre outras (4).

2. ADITIVOS ALIMENTARES

Desde a antiguidade que um dos maiores problemas da humanidade se concentra na conservação de alimentos, a fim de os manter em condições ideais de consumo durante um longo período de tempo, mantendo as suas características organoléticas, adiando assim a sua deterioração. Neste sentido, foram introduzidos no setor alimentar aditivos naturais e artificiais, que ao serem adicionados aos alimentos, restringem tanto quanto possível, os processos biológicos nocivos que ocorrem no produto (tais como o desenvolvimento de patogénicos e os efeitos de enzimas que afetam a frescura e a qualidade dos alimentos) (14).

Num mercado global cada vez mais competitivo, o método mais barato de conservação dos alimentos é muitas vezes o escolhido, sendo por isso, na grande maioria das vezes, usados aditivos artificiais em detrimento dos naturais. Estes aditivos alimentares modernos são geralmente produtos químicos artificiais, tais como sorbatos, benzoatos, nitratos e nitritos, com função conservante (15), ou ainda a substâncias como a tartrazina, carmoisine e allura red, as quais detém funções corantes. No entanto, estes aditivos alimentares são cada vez mais associados a efeitos secundários adversos e a possíveis riscos de toxicidade para os consumidores, enquanto que a aplicação e utilização de aditivos naturais é vista como sendo uma prática mais segura e saudável (16). Estudos recentes alertaram sobre os riscos não negligenciáveis à saúde decorrentes do consumo dos aditivos artificiais, mesmo quando presentes abaixo dos limites recomendados, conforme definido por agências reguladoras, como a FDA. Esses riscos para a saúde incluem, entre outros, reações alérgicas, distúrbios gastrointestinais, cancro, entre outros (15).

No entanto, é esperado que a transição de aditivos artificiais para alternativas naturais seja lenta, principalmente devido a questões de eficácia, estabilidade, e ainda questões económicas que ainda precisam ser ultrapassadas. Consequentemente, os consumidores procuram produtos claramente rotulados em que se garantam a ausência de aditivos artificiais e em que a segurança biológica dos produtos tenha sido feita pela adição de substâncias de origem natural (17).

Ao longo das duas últimas décadas, tem-se verificado um aumento do interesse na caracterização química e bioativa de diversas matrizes naturais. Este facto, juntamente com um maior conhecimento das vantagens das refeições nutritivas e dos desenvolvimentos na instrumentação analítica, levou a comunidade científica a estudar

os produtos e subprodutos de diferentes matrizes alimentares vegetais como fonte de substâncias bioativas, sendo este um dos principais temas de desenvolvimento e inovação estabelecidos pela União Europeia no âmbito do programa-quadro Horizonte 2020.

2.1. Corantes naturais

O fenómeno das cores pode ter várias origens, desde a dispersão até à absorção da luz, ocorrendo diferentes processos que originam uma gama de cores encontradas na natureza. A cor é a primeira característica notável de um alimento ou bebida e geralmente predetermina uma expectativa de sabor e aroma (1,3,11,18–20). Esta é uma das principais características apelativas para o consumidor na hora de escolher um produto alimentar, sendo determinante na sua preferência (20,21).

Os corantes alimentares podem ser classificados em três grupos: corantes alimentares naturais, relativos aos que são produzidos a partir de plantas, invertebrados ou minerais; corantes naturalmente idênticos, que embora sintetizados pela indústria, mimetizam os corantes naturais; e os corantes artificiais/sintéticos (11).

Toneladas de corantes naturais e artificiais são usados diariamente, tendo como principal finalidade a melhoria ou alteração das cores dos produtos destinados à indústria alimentar. Atualmente, existem variadas razões pelas quais são usados corantes, designadamente: 1) compensação da perda de cor durante o processamento do produto, 2) exposição ao ar, 3) temperatura e 4) condições de armazenamento (3,4,7,19), 5) melhoria da cor natural de modo a tornar o produto mais atrativo aos olhos do consumidor (11,19), 6) fixação de cor a produtos incolores, e ainda 7) permitir ao consumidor identificar a olho nu os produtos desejados (19).

Para a coloração de alimentos e cosméticos, utilizam-se, cada vez mais, fontes naturais contendo diferentes classes de pigmentos, ganhando importância nestas indústrias. As exigências dos consumidores são elevadas, dada a sua preferência por alimentos com cores agradáveis resultantes dos corantes naturais. (2). Outro aspeto importante a respeito dos pigmentos é a sua atividade biológica, principalmente as suas propriedades antioxidantes. Em todo o caso, além de conferir “beleza”, os pigmentos naturais têm também outras funções importantes tais como a capacidade de realizar fotossíntese através da presença de clorofila e/ou carotenóides, sem os quais poderia não haver vida no mundo (6).

Quimicamente, os corantes naturais podem ser categorizados em três grupos principais: 1) os compostos heterocíclicos com estrutura tetrapirrólica, que compreendem as clorofilas presentes em vegetais, o heme e as bilinas encontradas em animais (6); 2) os compostos de estrutura isoprenóide, representados pelos carotenóides, encontrados em animais e, principalmente em vegetais; 3) os compostos heterocíclicos contendo oxigênio, como os flavonóides, que são encontrados em vegetais e frutos (6). Além destes existem ainda outros dois grupos de corantes: as betalaínas, que são compostos nitrogenados, e os taninos, que agrupam diversos compostos de estruturas altamente variáveis. Os corantes naturais mais usados comercialmente são o carmim, as curcuminas e as antocianinas (22), sendo que todos estes corantes já foram alvo de vários estudos (4).

Carotenóides

Os carotenóides são substâncias coloridas, pigmentos lipossolúveis, amplamente distribuídas na natureza, principalmente em plantas, variando de cor entre o vermelho, laranja e amarelo (6,23,24). Mais de 850 carotenóides diferentes são encontrados na natureza, em animais e vegetais, (24,25), dos quais apenas 40 são integrados na dieta humana (24). Alguns carotenóides, entre eles a luteína, a violaxantina, a neoxantina e o β -caroteno, são largamente distribuídos na natureza, enquanto outros, tais como o licopeno, a capsantina e a bixina, existem em grandes quantidades, mas apenas em algumas plantas.

Os carotenóides são divididos em carotenos, compostos constituídos apenas por carbono e hidrogênio (como β -caroteno e licopeno), e seus derivados oxigenados, as xantofilas (a β -criptoxantina e a lutéina) (23). Quimicamente, os carotenóides são substâncias tetraterpênicas, formadas por oito unidades de isopreno, de tal modo que a ligação isoprênica sofre reversão na parte central da molécula e, dessa maneira, os dois grupos metilo centrais ficam separados por quatro carbonos (24,25). A maioria dos carotenóides é termolábil, principalmente as xantofilas (20).

A luz solar direta ou luz ultravioleta podem causar a fotoisomerização cis/trans, podendo, inclusive, em condições mais enérgicas, causar a destruição desses pigmentos. Esses pigmentos são facilmente oxidados pelo oxigênio ou peróxidos e até mesmo pelo oxigênio do ar, dependendo ainda da luz, calor e presença de moléculas pro-oxidantes na sua constituição. Essas reações podem ser causadas pela formação de radicais livres.

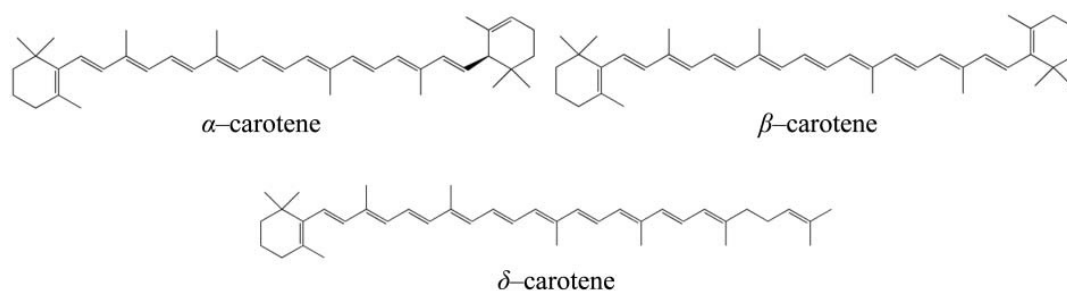
Dependendo do sistema, os carotenóides podem agir como pro-oxidantes ou antioxidantes (6,23,25).

Extratos naturais contendo carotenóides extraídos de plantas como o urucum, fruto do urucuzeiro, açafrão, paprica, tomate, entre outros, são comumente utilizados para colorir alimentos. Vários carotenóides de estrutura química idêntica aos produtos naturais foram sintetizados nos últimos anos e obtidos na sua forma pura e cristalina, entre eles o β -caroteno, a zeaxantina, a cantaxantina e a astaxantina (6). Os carotenóides são também conhecidos pelas suas propriedades antioxidantes e como precursores da vitamina A, sendo que o β -caroteno apresenta propriedades benéficas no tratamento da doença cardiovascular, assim como efeitos anti-carcinogênicos (24). O licopeno é também reconhecido como tendo efeito protetor no desenvolvimento do cancro da próstata e noutras linhas celulares cancerígenas, tais como no cancro da mama, do ovário, tumores gástricos, entre outros.

A paprica é extraída da planta *Capsicum annum* L., e é composta por capsantina e carotenóides capsorubin (24). Os frutos podem ser verdes, amarelos, alaranjados ou vermelhos, indicando diferentes fases de maturação, assim como a sua capacidade de sintetizar carotenóides ou clorofilas. Em termos de sabor, este vegetal abrange desde tipos doces (não-pungentes) como a paprica, até espécies ardentes como a pimenta ou a pimenta-de-caiena (26). Para além de características sensoriais como a pungência, aroma e cor, os pimentos são ricos em vitaminas e compostos bioativos de interesse que proporcionam vantagens para a saúde dos consumidores, tais como vitaminas C e E, provitamina A, carotenóides, e compostos fenólicos.

Quando comparados com outros pigmentos, os carotenóides demonstram ter melhor estabilidade relativamente a alterações de pH.

(I)



(II)

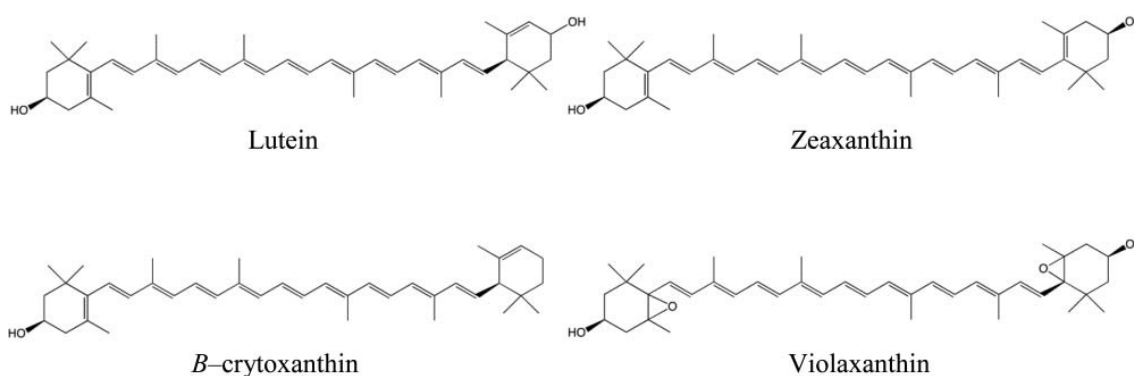


Figura 1. Estrutura química dos principais carotenos (I) e xantofilas (II). *Adaptado de Ngamwonglumlert et al. 2017.*

Antocianinas

Os flavonóides englobam uma classe muito importante de pigmentos naturais encontrados frequentemente na natureza. Estes podem ser divididos em antocianinas e flavonóides não antociânicos (FNA). As antocianinas são os corantes naturais hidrossolúveis mais estudados representando, juntamente com os carotenóides, a maior classe de substâncias coloridas do reino vegetal. Estas, encontram-se amplamente distribuídas em flores, frutos, folhas, plantas inteiras, e demais plantas superiores, sendo consumidas pelo homem desde tempos remotos (6,27). As antocianinas são pigmentos da família dos flavonóides, constituídas por um esqueleto de carbono de base C₆-C₃-C₆, no qual podem ocorrer modificações que culminam na síntese de centenas de moléculas de antocianinas encontradas na natureza (6,21).

Esta estrutura básica é o ponto de partida para uma infinidade de cores produzidas pela sua combinação química com glicosídeos e/ou grupos acilo, e pela sua interação com outras moléculas e/ou condições do meio (23). Alguns autores detetaram a existência de 17 antocianinas, com diferenças no número e posição de grupos hidroxil e/ou grupos de éter metílico, sendo 6 delas os constituintes mais comuns das antocianina deste tipo de pigmentos (6).

As antocianinas diferem entre si pelo número de grupos hidroxilo e/ou metoxilo presentes na aglicona e pela natureza, número e posição dos açúcares e dos ácidos alifáticos ou aromáticos ligados à molécula de açúcar, o que confere grande diversidade a este grupo de substâncias (6). Geralmente, os açúcares ligados à antocianina são a glicose, a arabinose, a galactose e a ramnose. Com menor frequência, podem ainda ser encontrados di e trissacarídeos ligados à mesma molécula (6). Em contraste com outros flavonóides, as antocianinas são capazes de absorver fortemente a luz na região do espectro visível, conferindo uma infinidade de cores, entre o laranja, o vermelho, o púrpura e o azul, dependendo do meio em que se encontram (28).

Entre as antocianinas mais comuns encontram-se a pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, malvidina e petunidina (23,24), as quais apresentam uma estabilidade e solubilidade inferiores quando comparadas com as correspondentes antocianinas e não são encontradas naturalmente nas espécies vegetais. Dependendo do grau de acidez ou alcalinidade, as antocianinas adotam diferentes estruturas químicas em meio aquoso. Neste, as moléculas de antocianinas coexistem em equilíbrio entre a forma catiónica colorida e a pseudo-base incolor, sendo este equilíbrio diretamente afetado com o aumento do pH (24). O pH ácido é benéfico para a forma colorida, diminuindo à medida que o pH aumenta. Algumas antocianinas são vermelhas em soluções ácidas, roxas ou violetas em soluções neutras e azuis em pH alcalino, razão pela qual a maioria dos corantes contendo antocianinas só podem ser usados em meio com pH inferior a 4 (6). Além destes, a cor das soluções de antocianinas depende de outros fatores, tais como concentração, tipo de solvente, temperatura, estrutura do pigmento, presença de substâncias capazes de reagir reversível ou irreversivelmente com a antocianina, entre outras (29).

Os flavonoides não antociânicos incluem duas classes principais de compostos, as flavonas e os flavonóis. De todos os pigmentos que existem no reino vegetal com a estrutura da fenilbenzopirona, as flavonas e os flavonóis são, sem dúvida, os mais abundantes, dos quais aproximadamente 300 compostos já foram identificados (6).

A significância desses pigmentos com relação à cor das espécies vegetais limita-se às espécies amareladas, e à copigmentação com antocianinas. A distinção entre as flavonas e flavonóis é muito pequena, uma vez que flavonóis são flavonas, nas quais a posição 3 está hidroxilada. No entanto, esses dois grupos de compostos podem ser diferenciados pelas suas propriedades espectroscópicas e separados facilmente por métodos cromatográficos. Entre as flavonas, apenas a luteolina, a apigenina e a tricetina são comuns na natureza, das quais derivam a estrutura de outras agliconas. Os flavonóides não antociânicos, pelo fato de serem fracamente coloridos, pouco influenciam a cor dos alimentos; embora o campferol e a quercetina sejam encontrados em quase 50% das plantas analisadas até o momento, pouco se sabe sobre o comportamento desses compostos em alimentos. O caráter fenólico dos flavonóides não antociânicos confere a esses flavonóides a capacidade de sequestrar metais, fazendo destes compostos com funções antioxidantes em óleos e gorduras. De facto, no geral, uma função muito importante dos flavonoides nos alimentos está relacionada com as propriedades antioxidantes desses complexos.

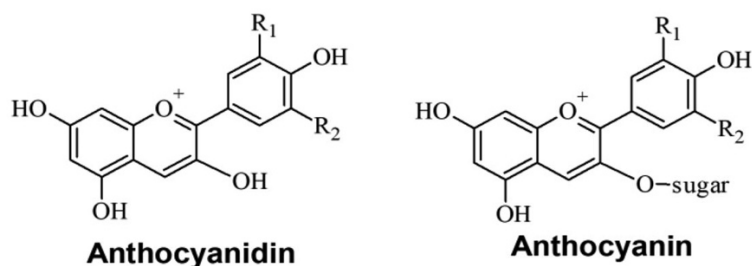
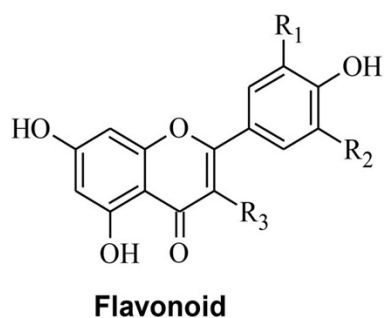


Figura 2. Estrutura das principais antocianinas. *Adaptado de Albuquerque et al. 2020.*



R₃ = OH = Flavonols R₃ = H = Flavones

Figura 3. Estrutura química de flavonas e flavonóis. *Adaptado de Albuquerque et al. 2020*

Clorofilas

Dentre os pigmentos presentes na natureza, as clorofilas são as mais abundantes no reino vegetal, sendo as únicas responsáveis pela cor verde encontrada nos tecidos vegetais das plantas. No entanto, estas têm sido as menos estudadas enquanto corantes naturais. Podem encontrar-se cinco classes de clorofilas no reino vegetal, entre elas a clorofila a, b, c, d e e. As clorofilas a e b são as mais comumente encontradas em vários tecidos vegetais e em frutos. As diferenças encontradas entre estes compostos são o grupo substituído: a clorofila a) tem um grupo metilo (CH₃) que lhe confere uma cor verde-azulada, enquanto que a clorofila b) tem um grupo aldeído (CHO), que lhe confere uma cor amarelo-esverdeada

As clorofilas são altamente sensíveis ao calor, à luz, ao oxigênio, ácidos, e enzimas, levando à fácil degradação e alteração da sua cor (23,24).

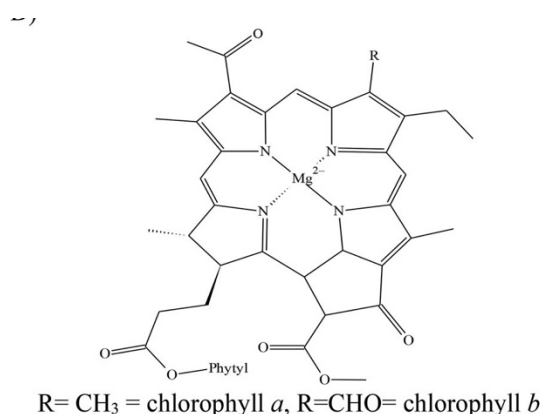


Figura 4. Clorofilas. Adaptado de Albuquerque et al., 2020 (24).

Curcuminas

A curcumina é o principal corante presente nos rizomas da cúrcuma (*Cúrcuma longa*), o dito açafrão-da-terra originário da Índia. Além de ser utilizada como corante e condimento, a cúrcuma apresenta substâncias antioxidantes e antimicrobianas que lhe conferem a possibilidade de utilização na indústria cosmética, têxtil, medicinal e de alimentos (30). A cúrcuma contém três componentes amarelos/alaranjados, entre eles a curcumina (CC) e seus dois derivados demetoxilados, a demetoxi-curcumina (DMC) e a bis-demetoxicurcumina (BDMC). Três tipos de extratos são comumente obtidos a partir

do rizoma da cúrcuma, sendo eles o óleo essencial, a óleo-resina e a curcumina. A diferenciação entre os três componentes da cúrcuma faz-se pela cor e pelo aroma.

O extrato de curcumina, produzido pela cristalização da oleoresina, apresenta níveis de pureza em torno dos 95%, e tem na sua constituição o responsável pela sua capacidade corante, apresentando contudo poucos componentes aromatizantes característicos da cúrcuma. A curcumina pura não é indicada para aplicação direta em alimentos, devido à sua insolubilidade em água. Por isso, é comum misturar a curcumina com solventes e emulsificantes de grau alimentício. Adicionalmente, é possível encontrar suspensões de curcumina em óleo vegetal. Uma vez adequadamente dispersa em meio aquoso, a curcumina apresenta cor amarelo limão em meio ácido, e laranja em meio básico, sendo estável ao aquecimento. A curcumina é sensível a luz, fator que usualmente limita o seu emprego em alimentos. Pode ser usada sozinha ou em combinação com outros corantes, em sobremesas, gelados, iogurtes e óleos (31).

Betalainas

As betalainas, tal como os flavonóides, são pigmentos hidrossolúveis, que podem passar da cor vermelho-roxo a amarelo, dependendo da estrutura do pigmento, sendo encontradas exclusivamente em plantas, e apresentando um comportamento e aparência semelhantes às antocianinas (23,24). Na literatura antiga eram conhecidas como antocianidinas nitrogenadas. As betalainas são encontradas principalmente na ordem Centrospermeae, à qual pertence a beterraba (*Beta vulgaris*), sendo os seus pigmentos facilmente extraídos com água. Apesar de escassamente estudada, a espécie *Amaranthus Caudatus* L. é particularmente rica em betacianinas, tornando esta planta numa excelente fonte para obtenção deste tipo de corante natural. As suas flores têm cor púrpura e são uma fonte rica de betalainas, ou seja, betacianinas com forte capacidade de coloração. Num estudo recente, a incorporação de AC em gelados mostrou resultados promissores no que respeita ao seu potencial de coloração (32).

As betalainas podem ser divididas em duas subclasses: 1) betacianinas – de cor vermelho-violeta, e 2) as betaxantinas – de cor amarelo a laranja. Curiosamente, mesmo detendo funções semelhantes, as antocianinas e betalainas parecem nunca coexistir na mesma planta, sendo aparentemente mutuamente exclusivas (23,33,34). Já as betalainas são pigmentos hidrofílicos e acumulam-se nos vacúolos das células, principalmente nos tecidos epidérmicos e subepidérmicos das plantas que os sintetizam (33).

Das betacianinas, fazem parte as betaninas e pequenas quantidades de isobetaninas e prebetaninas, além de dois pigmentos amarelos denominados vulgaxantina I e vulgaxantina II (6). Tal como as antocianinas, a estabilidade das betalaínas é dependente do pH - as betacianinas são mais estáveis em pH ácido, enquanto que as betaxantinas são mais estáveis em pH neutro (23,24). Estes pigmentos são instáveis na presença de luz e oxigênio, sendo estes destruídos quando submetidos a altas temperaturas (6,23). A atividade de água também afeta significativamente a sua estabilidade, uma vez que a reação de degradação envolve este solvente. Alguns autores estabeleceram que as betalaínas têm maior estabilidade em alimentos com baixa humidade e atividade de água (a_w) (6). Também o calor é fator crítico para a degradação destes componentes (23,24).

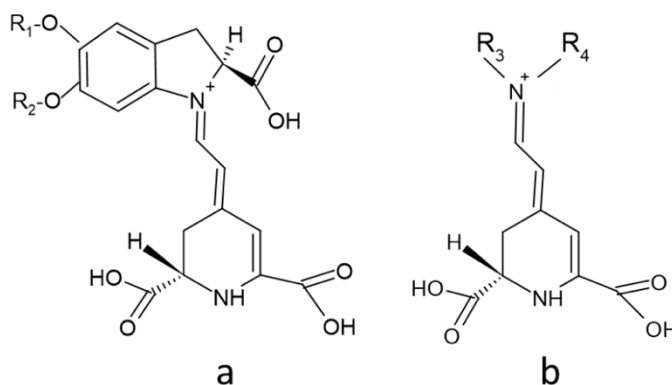


Figura 5. Estrutura química de Betacianina (a) e da Betaxantina (b). *Adaptado de Albuquerque et al. 2020*

2.2. *Vantagens e desvantagens dos aditivos naturais*

A satisfação do consumidor não é apenas alcançada através das características organolépticas dos alimentos, mas também pelos seus potenciais efeitos benéficos para a saúde e capacidade de agir como promotores de longevidade e qualidade de vida. Por conseguinte, o interesse dos consumidores em alimentos saudáveis, ingredientes bioativos, alimentos funcionais, e mesmo "super alimentos" tem sido largamente observado, ao ponto de os ingredientes de origem natural com o menor processamento possível, ganharem cada vez mais a liderança no mercado. Por isso, a indústria alimentar está cada vez mais concentrada na descoberta de alternativas eficazes e seguras a muitos aditivos alimentares de origem sintética, uma vez que estes já demonstraram potenciar vários efeitos secundários nocivos, e situações de toxicidade a curto ou longo prazo.

Os antioxidantes naturais têm efeitos benéficos contra doenças neurodegenerativas induzidas pelo stresse oxidativo. Os compostos fenólicos são o grupo mais importante de compostos antioxidantes naturais, dada a sua atividade comprovada bem como importantes efeitos benéficos para a saúde humana, tais como efeitos anticancerígenos e antidiabéticos. Esses compostos também ajudam a prevenir doenças cardiovasculares, cerebrais e ajudam a regular o sistema imunológico (35).

Os benefícios dos aditivos naturais são infinitos, a sua sinergia e potência são um grande salto em relação aos aditivos artificiais que realizam, na maioria dos casos, apenas um efeito sobre os alimentos. Embora nem todos os aditivos naturais sejam produzidos da mesma maneira, eles tendem a ser mais seguros do que os produzidos artificialmente. No entanto, a toxicidade é sempre um detalhe que não deve ser esquecido.

Relativamente às limitações, por um lado, o preço dos aditivos naturais deve ser razoável quando comparado com os compostos sintéticos que exercem o mesmo efeito, caso contrário não serão considerados uma opção para alimentos devido ao competitivo mercado globalizado. Por outro lado, deve-se continuar a contemplar a instabilidade dos conservantes naturais e a sua preservação, assim como as doses necessárias para a atividade efetiva das suas propriedades antimicrobianas nos alimentos, as quais geralmente excedem seu nível de aceitação organoléptica (36).

No que diz respeito aos corantes, existe atualmente a percepção comum de que os corantes naturais são melhores do que os corantes sintéticos, do ponto de vista da saúde humana. Alguns corantes sintéticos foram já muitas vezes referenciados como sendo a causa de reações adversas, tais como o aumento de comportamentos associados à hiperatividade em crianças, e por isso banidos do mercado, entre eles a tartrazina, a “quinoline yellow”, “sunset yellow”, “ponceau 4R”, “allura red” e a “carmoisine”. (3,37).

As antocianinas são comumente ingeridas pelos seres humanos, principalmente devido ao consumo de frutas, vegetais e vinhos tintos (27). Nos últimos anos, vários estudos têm evidenciado o seu potencial efeito benéfico na saúde. Neste sentido, foi proposto por alguns autores, que o seu consumo poderia potenciar efeitos protetores no cérebro humano, fígado e rins, podendo ainda desempenhar um papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares, controlo da obesidade e tratamento de cancro (29,38,39). Outros estudos mostraram ainda que dietas ricas em antocianinas poderão reduzir o risco de doenças degenerativas e declínio cognitivo (29).

No entanto, pigmentos extraídos de plantas apresentam algumas desvantagens relativamente à estabilidade, quando comparados com corantes artificiais, tais como:

instabilidade à luz, sensibilidade ao calor ou pH, baixa solubilidade em água (4,16), sensibilidade na presença de determinados solventes (27), enzimas, proteínas e ainda de íons metálicos. Além disso, muitos destes compostos não estão disponíveis continuamente durante todo o ano (4,27).

Apesar disso, os corantes naturais parecem ser mais seguros, e desprovidos de efeitos secundários nocivos. Estes, são ainda capazes de conferir e/ou potenciar alguns efeitos benéficos (4) ao produto alimentar a que são adicionados. As antocianinas, bem como outros flavonóides presentes nas frutas e vegetais, protegem contra uma variedade de doenças, particularmente doenças cardiovasculares e alguns tipos de cancro (27).

É importante referir que investigadores do setor alimentar acreditam que esta tendência de preferência de corantes naturais irá continuar no futuro. Nesse sentido, a procura de soluções específicas para os problemas de disponibilidade e estabilidade dos pigmentos naturais em substituição dos sintéticos tem de ser continuada no tempo. Além disso, um dos principais problemas ainda a ser resolvido é o facto de os corantes naturais não abrangerem todo o espectro de cores, como por exemplo o azul (6).

2.3. Métodos e fontes de obtenção de compostos naturais

Os métodos de extração, especificamente para compostos de origem vegetal, devem ser selecionados de acordo com a estrutura a ser utilizada (raiz, caule, folhas, frutos, sementes) e com as moléculas-alvo. A escolha do método de extração está vinculada à estrutura e à composição da matriz, sendo por isso fundamental o conhecimento das propriedades dos compostos de interesse e o seu comportamento frente aos diferentes solventes, temperaturas, pressões, entre outras características.

As fontes de antioxidantes naturais podem ser extremamente variadas, uma vez que a grande maioria das plantas contém antioxidantes que lhes permitem proteger-se da radiação solar e pragas, além de regular a produção de energia química. No entanto, as melhores alternativas para a indústria alimentar são ervas e especiarias, devido à sua constituição fitoquímica, rica em terpenos e terpenóides.

Relativamente às antocianinas, uma das principais questões relativas à sua manipulação é a sua elevada suscetibilidade à degradação, particularmente quando isoladas. Vários fatores físico-químicos são conhecidos por interferir com a estabilidade das antocianinas, pelo que o conhecimento da química básica destas é necessário e fundamental para compreender melhor as limitações de um protocolo de extração

específico. As antocianinas estão frequentemente incluídas nos organelos intracelulares; por conseguinte, a acessibilidade depende da capacidade dos solventes para entrar nestas estruturas e da sua integridade.

Portanto, o pré-tratamento dos tecidos a fim de facilitar a extração poderia ser uma abordagem interessante para aumentar a eficiência de extração, embora qualquer procedimento deva ser feito tendo em conta as limitações impostas pela natureza química das próprias antocianinas.

2.4. Técnicas de extração convencional

Os primeiros passos-chave no desenvolvimento de constituintes fitoquímicos bioativos das amostras para estudo são os procedimentos de pré-extração e extração. A extração com solventes orgânicos é o método tradicional mais comumente utilizado no isolamento de compostos bioativos, tais como antioxidantes naturais. O rendimento da extração dos extratos depende do tipo de solvente, devido à polaridade dos compostos, do pH, do tempo e da temperatura de extração, de forma que o solvente é sempre escolhido em função da sua afinidade com as moléculas-alvo.

Extração por Soxhlet

Esta extração (sólido-líquido ou líquido-líquido) envolve a escolha de solventes e o uso de calor e/ou agitação (40). Um processo de extração sólido-líquido é normalmente executado com um equipamento de Soxhlet, onde o material da amostra vegetal é colocado em contacto com um solvente condensado. As vantagens do uso do Soxhlet incluem, entre outras, o seu fácil manuseamento ao colocar o solvente fresco em contacto com a matriz sólida, sem necessidade de agitação nem filtração durante o processo. No entanto, possui também desvantagens, como a necessidade de grandes quantidades de solvente e, conseqüentemente, um processo de evaporação/concentração maiores e a possível degradação térmica dos compostos, uma vez que o processo é geralmente realizado no ponto de ebulição dos solventes por um longo período de tempo (6,41). O rendimento da extração depende de vários fatores, como o tipo de solvente usado (polaridade), da temperatura de extração, do tempo e razão solvente/amostra. A escolha

do solvente depende da natureza dos compostos que se pretendem extrair, sendo que o rendimento da extração é influenciado pela solubilidade da amostra no solvente a ser utilizado. A proporção solvente/amostra vegetal deve ser otimizada para usar uma concentração adequada de solvente que evite a sua saturação nas moléculas extraídas durante o processo de extração (42). Um processo preliminar de extração sólido-líquido pode ser necessário para a remoção de substâncias fenólicas e não fenólicas indesejadas, uma vez que estas podem ser ficar fixadas a componentes insolúveis, como ceras, terpenos ou gorduras (43). Podem ser usados diferentes solventes para extração, separadamente ou misturados entre eles, incluindo: etanol, acetona, metanol, hexano e ainda água (6).

Extração por maceração

A extração convencional através da maceração refere-se à recuperação de compostos bioativos de matrizes vegetais utilizando solventes convencionais (com ou sem tratamento térmico). A matriz vegetal é inicialmente homogeneizada e embebida num solvente (ou mistura de solventes), frequentemente sob agitação constante, pelo que as moléculas desejadas são extraídas com base em fenómenos de difusão e transferência de massa (44).

Dado que os metabolitos apresentam diferentes propriedades físico-químicas, nomeadamente polaridade e solubilidade, investigadores na área dos produtos naturais realizam geralmente extrações sucessivas com solventes de diferentes polaridades, começando pelos solventes à base de alcanos apolares (por exemplo, n-heptano, n-hexano, ciclo-hexano) até aos solventes intermédios (por exemplo, diclorometano, acetato de etilo) e solventes polares (álcoois e água) (45).

Apesar das suas vantagens práticas e da sua ampla utilização, este método pode apresentar vários inconvenientes, incluindo o consumo excessivo de tempo e solventes, e o facto de ter um baixo rendimento de extração de metabolitos pouco solúveis à temperatura ambiente (46). Além disso, uma separação completa dos constituintes naturais entre solventes raramente pode ser alcançada, e os mesmos compostos podem ser recuperados (em proporções variáveis) dentro de vários eluentes diferentes.

Por exemplo, uma das principais questões com a manipulação de antocianinas é que elas são altamente suscetíveis à degradação, particularmente quando isoladas. Assim, o

pré-tratamento dos tecidos a fim de facilitar a extração poderia ser uma abordagem interessante no sentido de aumentar a eficiência de extração, embora qualquer procedimento deva ser feito tendo em conta as limitações impostas pela natureza química dos grupos de pigmentos em questão.

Extração por infusão e decocção

A infusão e a decocção, tal como a maceração, implicam a imersão do material vegetal em água fria ou a ferver. Em comparação com a infusão e com a maceração, a decocção é tipicamente mais eficiente com compostos solúveis em óleo, e o seu procedimento permite a extração de produtos químicos estáveis de materiais vegetais duros como raízes e cascas na presença de calor (47). Na decocção o material é mantido em água a ferver durante 15-30 minutos (48). No caso da infusão, um certo volume de água fria ou a ferver, é adicionado à amostra moída durante um breve período de tempo. Ambos os procedimentos são frequentemente utilizados na extração de componentes bioativos de ervas e chás, bem como na extração de antioxidantes de matrizes vegetais em caso de decocção (48).

Extração por percolação

A percolação é um método de adição suave de solvente a matrizes de pó sólido utilizando um percolador. Durante este procedimento, o solvente absorve os componentes solúveis e passa através do fundo filtrante do recipiente a um ritmo moderado num processo contínuo até a extração estar completa, momento em que é evaporado para concentrar os extratos (47). O benefício fundamental desta tecnologia é o tempo de processamento mais rápido, melhor flexibilidade e, em certas situações, extração química exaustiva (49). Além disso, a etapa de filtragem é desnecessária nesta técnica, uma vez que o próprio percolador contém um filtro no fundo que permite a recolha apenas do líquido final.

Apesar de ser mais eficiente do que a maceração, as dificuldades desta técnica são semelhantes às das encontradas na maceração, incluindo a sua duração, a necessidade de grandes volumes de solvente, a solubilidade dos polifenóis, o tamanho das partículas da amostra e o tempo de contacto entre o solvente e a amostra (50).

2.5. *Técnicas de extração emergentes*

Existem atualmente, métodos mais sofisticados usados na extração de compostos bioativos de interesse, tais como a extração com fluidos supercríticos, alta pressão hidrostática, extração assistida por microondas e ultrassons.

Extração por fluido supercrítico

A extração com Fluido Supercrítico é um processo ambientalmente amigável alternativo à extração convencional, realizado com solventes orgânicos, tanto para a preparação analítica de amostras como para aplicações em escala de produção, principalmente quando um solvente limpo, como o dióxido de carbono é usado em vez de solventes tóxicos. Além disso evitam o uso de grandes quantidades de solventes indesejáveis e nocivos na indústria alimentar (14,51). Esta técnica consiste no seguinte: a temperatura crítica é definida como a mais alta temperatura na qual um gás pode ser convertido em líquido, devido a um aumento de pressão. A pressão crítica consiste na mais alta pressão na qual um líquido pode ser convertido num gás, devido a um aumento de temperatura. Essas propriedades caracterizam o ponto crítico (PC). Acima desse ponto existe a região supercrítica na qual o composto se apresenta como um fluido de uma única fase, não condensável, exibindo algumas propriedades físico-químicas típicas de gases e outras típicas de líquidos. Além disso, esta técnica é realizada na ausência de luz e oxigênio, o que reduz a degradação dos compostos (52). A extração por fluido supercrítico é especialmente interessante para a extração compostos lipofílicos, como lípidos, óleos essenciais e compostos aromáticos. As vantagens deste tipo de extração assentam na possibilidade de ajustar a potência do solvente do fluido por mudanças de pressão e temperatura, ao mesmo tempo que modifica outras propriedades físico-químicas tais como densidade, viscosidade e difusividade (51). O dióxido de carbono é o solvente comum mais utilizado nesta técnica para se obter as condições ótimas de extração, devido baixa toxicidade, baixo custo, fácil separação dos solutos extraídos, e à sua compatibilidade com as matrizes em estudo, e ainda à possibilidade de ser usadas, quando necessárias, baixas temperaturas (6).

Os extratos resultantes da extração por fluidos supercríticos são limpos e puros, possuem alta qualidade e os seus aromas têm grande semelhança com os aromas das

plantas originais antes do processo de extração. As temperaturas utilizadas na extração (rondam os 35 °C) permitem que esses processos sejam utilizados para compostos termica e quimicamente sensíveis, mantendo a qualidade do produto final, sendo possível portanto aplicar esta técnica na extração de óleos essenciais (51). Esta técnica tem por isso grande interesse ao nível da indústria alimentar, cosmética e farmacêutica, uma vez que substituem os processos de extração convencionais.

Extração assistida por ultrassons

O mecanismo de extração assistida por ultrassons é baseado no fenómeno de cavitação. A propagação de ultrassons em sistemas líquidos é feita através de uma série de ondas de compressão e rarefação, que podem induzir a produção de bolhas de cavitação dentro do fluido. Durante a extração de componentes bioativos através este tipo de extração, as elevadas temperaturas e a pressão destroem as paredes celulares do material vegetal, facilitando a libertação de compostos bioativos e melhorando o transporte de massa entre os diferentes compartimentos do material vegetal. A transferência de calor desta extração é feita do exterior para o interior da célula, sendo que esta direção é a oposta à da extração assistida por micro-ondas (46).

A frequência, intensidade, temperatura e tempo de extração por ultrassons pode afetar diretamente tanto a eficiência como o rendimento da extração. Além disso, os tipos e o volume de solvente, bem como as características da amostra, tais como o teor de humidade e o tamanho das partículas, são também fatores importantes para uma extração eficaz. Eventualmente, estas características permitem reduzir o tempo de extração, a quantidade de solvente utilizado e o consumo de energia. Além disso, a extração por ultrassons pode também ser aplicada em combinação com outros métodos, tais como a extração por soxhlet, extração por microondas, extração de fluidos supercríticos e extrusão.

Extração assistida por microondas

Durante a extração assistida por microondas, este tipo de radiação electromagnética fornece energia ao solvente e à matriz vegetal, energia esta que pode ser absorvida por moléculas dentro das próprias plantas, particularmente as moléculas polares. As elevadas

pressões térmicas localizadas e o stress mecânico causado pelas microondas alteram significativamente as propriedades físicas das paredes celulares, resultando na sua ruptura e na libertação dos componentes-alvo (46,53). Esta não é uma técnica apropriada para extracção de antioxidantes, devido ao efeito térmico da irradiação por microondas, o que pode resultar na redução do rendimento da extração. Além disso, este tipo de extração só pode ser aplicável a solventes de extracção capazes de absorver micro-ondas (46). Vários factores influenciam a seleção do solvente adequado, nomeadamente a relação do matriz em estudo com o solvente, a temperatura e o tempo de irradiação, a potência da radiação aplicada, e as características da própria matriz. Os solventes devem ainda ser escolhidos de acordo com a solubilidade do analito de interesse e a capacidade do solvente para absorver micro-ondas (46).

A utilização de microondas é outra técnica de extração verde, uma vez que permite a redução do tempo de extração e dos volumes de solvente utilizados para o efeito, e pode ser realizada em sistemas abertos ou fechados (46).

2.6. Métodos de identificação e quantificação de composto bioativos

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A determinação qualitativa e quantitativa de antocianinas em plantas pode ser realizada por métodos clássicos (espectrofotométricos) ou contemporâneos (HPLC) acoplados a vários tipos de espectrómetros de massa ou aparelhos de Ressonância magnética nuclear (RMN) (27). A cromatografia líquida de alta eficiência é um método utilizado para separar, identificar e quantificar componentes de uma mistura, tais como compostos químicos ou elementos biológicos de uma dada amostra, sendo um método muito útil para o estudo de diversos grupos de moléculas como os compostos fenólicos.

Um sistema típico de HPLC inclui uma fase estacionária, uma fase móvel com polaridade variável, e um detetor, dependendo do tipo de moléculas em estudo. A fase móvel é frequentemente composta por dois solventes com polaridades opostas que são utilizados de dois modos, isocrático ou gradiente, permitindo que a polaridade total seja aumentada ou diminuída conforme necessário. A fase estacionária é tipicamente uma caixa de coluna sólida de alguns centímetros de comprimento que aloja partículas de

suporte de sílica e um material ligado imobilizado sobre elas para efetuar a separação dos componentes da substância a analisar.

No HPLC, as colunas de fase reversa são as mais utilizadas, principalmente a coluna octadecil (C18), com comprimentos entre 150 e 250 mm e tamanhos de partícula entre 3-5 μm . As fases móveis da eluição são frequentemente binárias (em modo gradiente), com um solvente aquoso acidificado (solvente A) como o ácido acético aquoso, ácido perclórico, ou ácido fórmico e um solvente orgânico como o metanol ou acetonitrilo, que é normalmente acidificado (solvente B) (54).

Cromatografia de camada fina

Devido ao seu baixo custo, simplicidade, curto tempo de análise, grande sensibilidade e notável repetibilidade, a cromatografia de camada fina (“Thin Layer Chromatography” - TLC) é uma das técnicas mais simples e rápida para a identificação de compostos. A TLC é utilizada numa variedade de sectores e disciplinas de investigação, incluindo na indústria farmacêutica, análise clínica, química industrial, toxicidade ambiental, química alimentar, análise inorgânica e de pesticidas, pureza de corantes, cosméticos, materiais vegetais, entre outras. As placas de vidro são cobertas com um revestimento homogêneo de sílica gel na sua forma mais básica (SiO_2).

A amostra dissolvida é colocada na placa, que depois é colocada num frasco de tapado contendo o solvente de eluição e papel de filtro. Quando o solvente chega perto do topo da placa, é removido, seco, e visto à luz UV ou fluorescência. Variações neste processo são utilizadas de acordo com moléculas em estudo, incluindo o pré-tratamento da amostra, modificação do eluente, material da placa, métodos de deteção e visualização, e utilização da TLC conjugado com outras técnicas como HPLC e RMN.

2.7. Inclusão de corantes naturais em alimentos

A produção de pigmentos naturais de origem vegetal não é ilimitada, sendo estes metabolitos secundários. Além disso, a agricultura deve continuar a focar-se na produção de alimentos para uma população em contínuo crescimento.

Não há dúvidas de que a cor dos alimentos é relevante para a produção de alimentos básicos da alimentação de milhões de pessoas. No entanto, a procura por alimentos mais naturais, com melhores características aumenta cada dia, dado existirem áreas sociais importantes que cada vez mais procuram alimentos que possam proporcionar benefícios para a saúde, onde podem ser incluídos os alimentos incorporados com corantes de origem natural, em alternativa aos artificiais.

Após vários estudos científicos terem atribuído alguns efeitos alergénicos ao uso de corantes artificiais, as entidades reguladoras, nomeadamente a EFSA e FDA aboliram a utilização de alguns destes aditivos corantes, levando a que indústria alimentar iniciasse o processo da sua substituição por corantes de base natural, mais saudáveis e sem efeitos adversos.

No entanto, os corantes de base natural apresentam alguns problemas, nomeadamente a sua estabilidade a diferentes condições de pH, temperatura, luz, entre outros. Assim, a exploração de matrizes naturais como possíveis fontes de moléculas corantes é hoje em dia um dos principais focos de investigação. Deste modo, o modo de extração, a capacidade corante, a estabilidade ao longo do tempo são fatores a ter em conta no desenvolvimento de moléculas corantes com potencial aplicação industrial.

Diversas moléculas de origem natural, apresentam também outras funções de interesse, para além da capacidade de conferir cor, podendo também atuar como ingredientes funcionais. Os ingredientes funcionais ajudam na promoção de condições ideais de saúde, podendo reduzir os riscos de uma ou mais doenças não transmissíveis, tais como dislipidemias, cancro, diabetes tipo 2, acidente vascular cerebral (AVC) e doenças cardiovasculares.

Existem inúmeros fitoquímicos na dieta quotidiana benéficos para a saúde humana, tais como os carotenoides (e.g. curcumina), e vários polifenóis (antocianinas). Estes agentes participam também na elaboração de alimentos funcionais e/ou nutracêuticos, que quando consumidos regularmente, demonstram ter benefícios associados específicos para a saúde humana (55).

3. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos:

- a) Avaliar as propriedades corantes de vários ingredientes de origem natural (extratos de *Capsicum annuum* L. (paprica), *Curcuma longa* L. (curcumina) e *Amaranthus Caudatus* L.
- b) Analisar produtos em fresco antes e depois da sua incorporação com os corantes naturais escolhidos, em produtos diferentes alimentares: manteiga, “cheesecake” e gelado;
- c) Avaliar a composição nutricional dos produtos desenvolvidos com os diferentes corantes incorporados em comparação com os mesmos produtos sem qualquer incorporação, ao longo do tempo de prateleira;
- d) Estudar a aceitação destes produtos por parte do consumidor através da elaboração de questionários após prova dos produtos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. *Preparação dos extratos*

As amostras de *C. longa* e *C. annuum* foram adquiridas em pó, numa área comercial em Bragança (nordeste de Portugal), e armazenadas em local escuro, ao abrigo da luz e da temperatura, até à posterior análise.

As amostras de *Amaranthus caudatus* L. foram adquiridas na empresa no Cantinhos das Aromáticas.

4.2. *Procedimento de extração*

Curcumina

Com o objetivo de detetar curcuminóides nas amostras de pó comercial de *C. longa* e, subsequentemente, definir todos os pontos do desenho composto central circunscrito (CCCD), foi realizada uma extração seguindo um procedimento previamente realizado por Lu *et al.* (2017) (56). Uma quantidade de 1,5 g de pó seco *C. longa* foi extraída com 50 mL de etanol/água (80:20 v/v), durante 10 min com 300W, à temperatura ambiente (25 °C). Após o processo de extração, o sobrenadante foi filtrado (papel Whatman No4) e filtrado novamente (0,2 µm filtros de nylon) para uma ampola (1,5 mL) para posterior injeção de HPLC.

Paprica

Foi realizada a extração de carotenóides das amostras comerciais de pó de paprica. Uma quantidade de 1,5 g de pó seco de *C. annuum* foi extraída com 50 mL de etanol (100%), durante 7.5 min com 360W, à temperatura ambiente (25 °C). Após o processo de extração, o sobrenadante foi filtrado (papel Whatman No4) e filtrado novamente (0,2 µm filtros de nylon) para uma ampola (1,5 mL) para posterior injeção de HPLC (56).

Amaranthus caudatus L.

Após otimização do processo de extração assistida por ultrassons, chegou-se a um extrato enriquecido em compostos de betacianinas, com uma concentração de 36 g de betacianinas, por kg de extrato. Foi realizada uma extração de 38 min, aplicando, um

poder ultrassónico de 487 W, utilizando água como solvente de extração, e a uma relação sólido líquido de 5 g de amostra por litro de solvente (57).

4.3. *Preparação dos produtos alimentares*

Gelado

Na preparação do gelado (**Figura 6**), foram utilizados 900 ml de leite Gordo Continte[®], composição por 100 ml: 271.96 KJ, ou 65Kcal de valor energético; 3.6 g de lípidos dos quais 2.3 g saturados; 4.9 g de hidratos de carbono, dos quais 4.9 g açúcares; 3.3 g de proteínas; 0.1 gr de sal e 0 g de fibras, foi misturado com 200 g de açúcar (açúcar branco granulado Continte[®]); composição por 100g: 1700KJ ou 400Kcal energético ; 0 g de lípidos; 100 g de hidratos de carbono dos quais 100 g eram açúcares; 0 g fibras; 0 g de proteína; e 0 g de sal. Depois, 250 g de crème fraiche (30% Massa gorda - Président[®]); composição por 100 g: 1198 KJ, ou 291 Kcal de valor energético; 30 g de lípidos, dos quais 22 g são saturados; 2.9 g de hidratos de carbono, dos quais 2.9 g de açúcares; <2 g de fibras; 2.3 g de proteínas; e 0.1 g de sal). Por fim foram adicionadas 8 gemas de ovos tamanho M Continte[®] (cada ovo de tamanho M tem um valor médio de gema de 15 g): 1420 KJ, ou 342 kcal de valor energético por 100 g; 30.9 g de lípidos dos quais 8.3 g saturados; 0 g de hidratos de carbono; 16 g de proteínas; 0.1g de sal e 0 g de fibras.

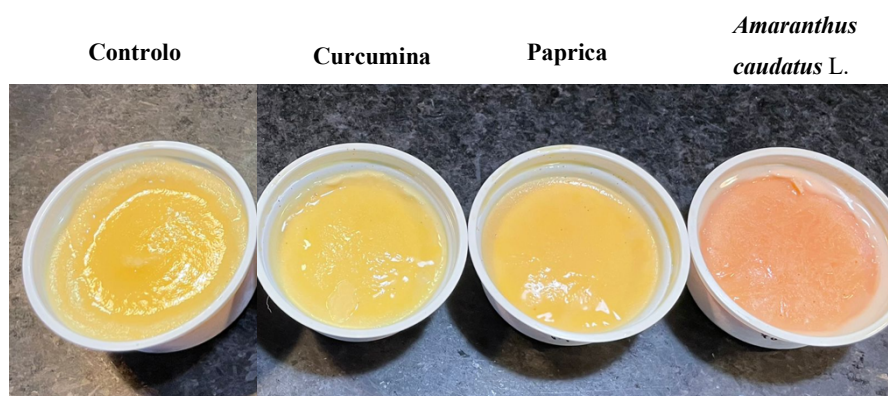


Figura 6. Gelados corados com diferentes corantes naturais.

“Cheesecake”

Para a preparação do “cheesecake”, 400 g de queijo creme Philadelphia ® foram utilizadas; composição por 100 g: 1104 KJ, ou 267 Kcal de valor energético; 26 g de lípidos dos quais 18 g saturados; 2.8 g de hidratos de carbono, dos quais 2.8 g açúcares; 4.1g de proteínas; 1.05gr de sal e 0.2 g de fibras, foi misturado com 175 g de açúcar (açúcar branco granulado Continente®); composição por 100g: 1700KJ ou 400Kcal energético ; 0 g de lípidos; 100 g de hidratos de carbono dos quais 100 g eram açúcares; 0 g fibras; 0 g de proteína; e 0 g de sal. Depois, 400 g de crème fraiche (30% Massa gorda - Président®); composição por 100 g: 1198 KJ, ou 291 Kcal de valor energético; 30 g de lípidos, dos quais 22 g são saturados; 2.9 g de hidratos de carbono, dos quais 2.9 g de açúcares; < 2 g de fibras; 2.3 g de proteínas e 0.1 g de sal.

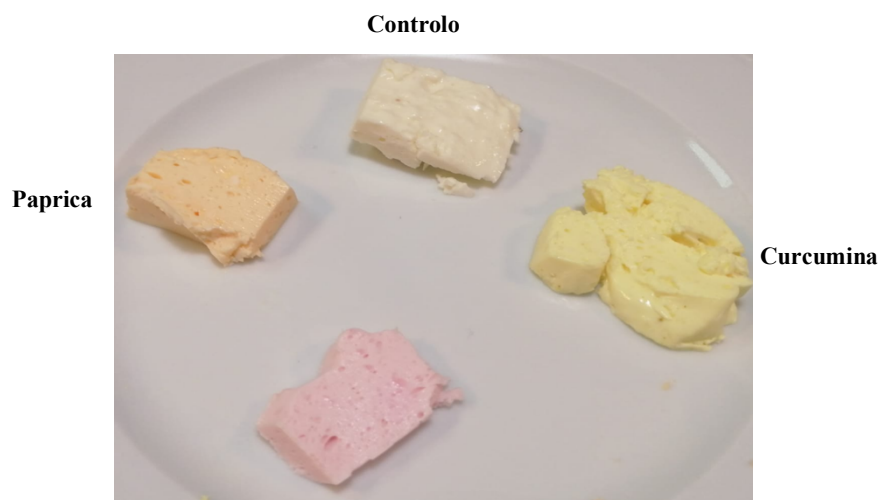


Figura 7. Cheesecake corados com diferentes corantes naturais

Manteiga

Para a preparação de manteiga, foram batidas 400 g de crème fraiche (30% Massa gorda - Président®); composição por 100 g: 1198 KJ, ou 291 Kcal de valor energético; 30 g de lípidos, dos quais 22 g são saturados; 2.9 g de hidratos de carbono, dos quais 2.9 g de açúcares; < 2 g de fibras; 2.3 g de proteínas e 0.1 g de sal.

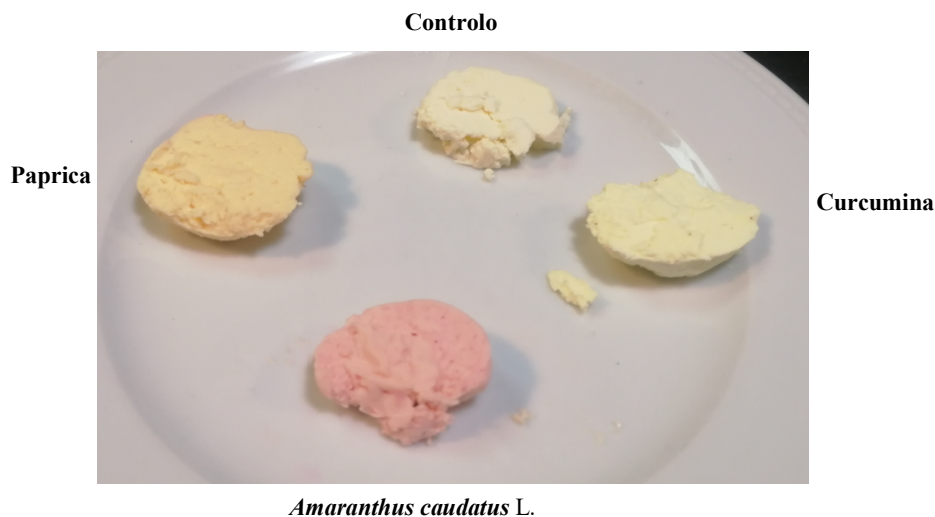


Figura 8. Manteigas coradas com diferentes corantes naturais.

Para todos os produtos, durante a preparação de cada um, a mistura mãe, foi constantemente misturada, depois dividida em partes iguais, à quais os corantes foram adicionados, até que a cor da mistura apresentada fosse homogénea.

Cada amostra foi congelada, liofilizada (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, USA) (58), e armazenada ao abrigo da luz e da humidade para posterior análise. A tabela 1 descreve a quantidade de corante adicionado a cada um dos produtos alimentares desenvolvidos.

Tabela 1. Quantidade de corante natural utilizado em cada amostra (mg/100g de produto).

	<i>Amaranthus Caudatus</i> L.	Paprica	Curcumina
“Cheesecake”	111.3 mg	79.9 mg	126.14 mg
Manteiga	723.3 mg	176.9 mg	111.8 mg
Gelado	162 mg	38.2 mg	31.6 mg

4.4. *Análise dos parâmetros físicos*

Humidade

As amostras em estudo foram testadas quanto à sua humidade (2g), usando para o efeito um analisador de humidade (Adam Equipment, PMB 163). Neste, a temperatura aumenta progressivamente até aos 105 °C, obrigando à evaporação da água contida na amostra alimentar em análise.

Após a estabilização do peso da amostra no equipamento, indicativa da perda total da água, este pesa novamente a amostra em análise e calcula a percentagem de água perdida durante o processo. Esta foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Percentagem de humidade} = (m_i - m_f) / m_i \times 100$$

Onde:

m_i - peso inicial

m_f - peso após a obtenção de um peso constante.

Cor

A cor das amostras em estudo foi medida em três pontos distintos das mesmas, utilizando para o efeito um colorímetro portátil (modelo CR- 400, Konica Minolta Sensing Inc., Tóquio, Japão) com uma abertura de diafragma de 8 mm e os valores de espaço de cor CIElab L^* (luminosidade), a^* (verde/vermelho), e b^* (azul/amarelo). A diferença de cor total (E^*) entre as amostras coloridas e a amostra de controlo foi calculada utilizando a equação:

$$\Delta E^* = \sqrt{(L_2^* - L_1^*)^2 + (a_2^* - a_1^*)^2 + (b_2^* - b_1^*)^2}$$

Atividade da água (aW) e pH

Um medidor portátil de pH foi utilizado para testar diretamente o pH em três locais distintos das amostras (Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, EUA), e a atividade da água foi medida utilizando um Medidor de Atividade da Água de Ponto de Orvalho 4TE (Aqua Lab, Cromer, Austrália).

4.5. *Análise da composição centesimal*

As amostras foram analisadas no sentido de estudar a sua composição centesimal - humidade, proteínas, gordura, cinzas, hidratos de carbono e energia, de acordo com os métodos oficiais de análise de alimentos da “Association of Official Analytical Chemist” (AOAC) (59).

Gorduras - Extração de Gorduras pelo método de Rose-Gottlieb

A extração de gorduras foi realizada de acordo com o método Rose-Gottlieb com algumas modificações (60,61). Este método permite determinar a quantidade de gordura em amostras de leite ou derivados, separando as proteínas e outros nutrientes naturalmente ligados a às gorduras neste tipo de produtos (59,61).

Neste sentido, as amostras foram tratadas com hidróxido de amónia e etanol, os quais vão promover a hidrólise da ligação proteína-gordura nas amostras em estudo.

O etanol precipita as proteínas dissolvidas na amónia e a gordura separada é então extraída com éter dietílico e éter de petróleo, usado para diminuir a solubilidade das substâncias não-lipídicas, solúveis no éter dietílico. A gordura extraída é determinada gravimetricamente e calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Gordura} = \frac{m_1 - m_2}{m_0} \times 100$$

Onde:

m0 = massa da amostra, em gramas;

m1 = massa do tubo de ensaio com gordura (massa constante), em gramas;

m2 = massa inicial do tubo de ensaio em gramas.

Proteínas

O teor de proteína foi analisado pela quantificação de nitrogénio (N), utilizando o método Macro-Kjeldahl (62). O processo é baseado na transformação do nitrogénio presente na amostra em sulfato de amónia, por meio da reação com ácido sulfúrico. Em seguida, a amónia presente no sal obtido é deslocada por uma reação com a solução de ácido bórico. A quantidade de nitrogénio será determinada por meio de titulação, e o resultado obtido será tratado para obtenção do teor de proteína ($N \times 6,38$) (59,63).

Cinzas

As cinzas referem-se aos resíduos inorgânicos remanescentes após a ignição ou oxidação completa da matéria orgânica numa amostra alimentar. A determinação do teor de cinzas de um alimento faz parte de uma análise importante para avaliação nutricional e é um importante atributo de qualidade para alguns ingredientes alimentares.

No presente estudo, o teor de cinzas foi determinado por incineração a 500 ± 15 °C numa mufla, durante 5 horas (59).

Hidratos de carbono e Energia

Os hidratos de carbono totais são calculados por diferença usando a equação:

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

A energia total foi calculada de acordo com a seguinte equação:

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

4.6. Avaliação da aceitação dos consumidores aos produtos desenvolvidos

A recolha de dados na população amostra foi efetuada através da aplicação de um questionário criado em através do Google Documents (**Anexo 1**), aplicado a clientes frequentadores do Restaurante Casa Nostra em Bragança. A estes, foi lhes dado para prova uma amostra de “cheesecake”, de gelado e manteiga com diferentes corantes naturais, nomeadamente amostras destas sobremesas com paprica (*C. annuum*, cor laranja), curcumina (*C. longa*, cor amarela) e *A. caudatus* (cor de rosa).

4.7. Análise estatística

Em toda a análise de amostras, os valores são apresentados por média \pm desvio padrão (DP). No que concerne à análise dos parâmetros das incorporações, os valores foram analisados através de uma ANOVA a 2 fatores, com soma de quadrados do tipo III, recorrendo ao software SPSS, versão 25. Este modelo de análise linear multivariado

permite tratar os dois fatores TP (tempo de prateleira) e TI (tipo de incorporação) de uma forma independente, permitindo entender a contribuição de cada um deles independente do outro, oferecendo uma melhor compreensão do comportamento dos vários parâmetros ao longo do tempo. Se uma interação significativa for registada ($p\text{-value}<0.05$) entre os dois fatores (TP×TI), estes são avaliados de uma forma simultânea e algumas conclusões são extraídas das médias marginais estimadas (MME). Caso não haja uma interação significativa entre fatores, isto é, quando a influência de um se sobrepõe à influência do outro para obter o resultado final, cada fator é avaliado independentemente, usando um teste de Tukey ou teste T-Student consoante os casos. Ao longo de todo o trabalho, o nível de significância é de 0.05

No caso dos dados obtidos em resposta ao questionário de aceitabilidade dos consumidores aos produtos, procedeu-se à análise descritiva da amostra através de tabelas de frequência (no caso das variáveis de natureza qualitativa) e da análise da média, máximo, mínimo e desvio padrão (no caso das variáveis de natureza quantitativa).

Para detetar relações entre as características sociais e de consumo de doçaria e a preferência de cores nos diferentes parâmetros (sabor, olfativos e aspeto geral) foram efetuados testes de independência do Qui-Quadrado.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com IBM SPSS Statistics 24.0 (Chicago, IL).

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

Os gelados, “cheesecakes” e a manteiga são produtos alimentares que, para além de agradáveis ao paladar, e de serem consumidos em quantidades significativas em Portugal, devem também ser apelativos à vista do consumidor, e, para esse efeito foram usados os corantes naturais desenvolvidos.

Para obter um melhor conhecimento da capacidade de coloração destes corantes, a cor foi medida com um colorímetro portátil.

O sistema CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) baseia-se na ideia de que a luz refletida a partir de qualquer superfície colorida pode ser visualmente combinada por uma mistura aditiva de três cores principais: vermelho, verde, e azul. L^* denota o grau de luminosidade, que varia de 0 (preto) a 100 (branco). A cor vermelha é representada por um valor a^* positivo, enquanto o verde é representado por um valor a^* negativo. Da mesma forma, os valores positivos e negativos b^* representam as tonalidades amarela e azul, respetivamente. A saturação ou pureza da cor é denotada por valores cromáticos a^* e b^* (64,65).

Os resultados relativos à análise dos parâmetros físicos das amostras em estudo, nos diferentes intervalos de tempo em estudo e com diferentes corantes, estão expressos nas tabelas abaixo apresentadas. A água não ligada a moléculas alimentares suporta o crescimento de bactérias, leveduras e bolores. O termo "atividade da água" (a_w) refere-se a esta água não ligada (65,66).

A atividade da água (a_w) define-se como a relação entre a pressão do vapor da água do alimento e a pressão do vapor de água pura à mesma temperatura. É avaliada numa escala de 0 a 1, onde 1 representa a água pura. Assim, quanto maior o valor de atividade da água, maior o risco de deterioração do alimento.

Esta é avaliada numa escala de 0 a 1, onde 1 representa a água pura. Assim, quanto maior o valor de atividade da água, maior o risco de deterioração do alimento. A atividade da água de um alimento não é referente ao seu teor de humidade. Embora os alimentos húmidos sejam suscetíveis de ter uma maior a_w , nem sempre isto se verifica. Muitos alimentos podem ter a mesma atividade da água e possuir diferentes níveis de humidade. A aplicação mais útil da atividade da água está na prevenção do crescimento de bactérias, leveduras e bolores. Para que um alimento tenha um período de vida útil é necessário controlar ou o seu nível de acidez (pH), ou o nível de atividade da água (a_w), ou uma

combinação adequada dos dois. Isto pode efetivamente aumentar a estabilidade do produto e tornar possível prever o seu prazo de validade sob determinadas condições de armazenamento conhecidas (65,67).

Considerando as incorporações nos “cheesecakes”, gelados e manteigas, foi analisado o valor nutricional, bem como o pH, atividade da água (aW), e as coordenadas L*, a* e b*. A representação das **Tabelas 2 a 19** seguem a análise simultânea dos dois fatores, o tempo de prateleira (TP) e tipo de conservante (TI) de uma forma independente para que se consigam entender melhor os efeitos de cada um deles nos resultados apresentados, ou se, porventura, houve uma interação entre eles. Assim, a parte superior da tabela representa a passagem do tempo de armazenamento, mas, incluído em cada um dos dias de análise estão todos os valores de cada um dos conservantes. Na parte inferior, em cada tipo de incorporação, estão incluídos os dois ou três tempos de análise. Quando cada um dos fatores pode ser analisado independentemente (p -value TP×TI > 0.05), então a classificação é feita recorrendo a testes *post-hoc* caso os valores individuais de significância sejam menores que 0.05 (valor considerado como significativo) contudo, quando (p -value TP×TI < 0,05) então, para alguns casos apenas tendências podem ser obtidas pelas médias marginais estimadas (MME).

5.1. “Cheesecake”

Paprica

Nas **Tabelas 2 a 7**, as incorporações de paprica, curcumina e *A. audatus* são comparadas aos cheesecakes controlo (sem incorporação), sendo possível verificar que nos “cheesecakes”, a humidade seguida dos hidratos de carbono são os constituintes mais abundantes. Relativamente aos hidratos de carbono, é possível assumir que esse valor é elevado devido à adição de açúcar durante a sua confeção. Na **Tabela 2**, para todos os parâmetros houve uma interação significativa, não permitindo tirar conclusões significativas, o que significa que a incorporação de paprica não alterou os parâmetros nutricionais dos cheesecakes.

Tabela 2. Composição centesimal do cheesecake incorporado com paprica e controlo, expressos em g/100g de massa fresca (mf).

		Humidade	Proteínas	Gordura	Hidratos de Carbono	Cinza	Kcal
Tempo Prateleira (TP)	0 Dias	58±3	11,6±0,2	50±13	37±13	1,1±0,1	645±65
	3 Dias	67±1	10,5±0,8	40±7	47±6	1,59±0,08	606±22
p-value (n=6)	T-Student	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Tipo Incorporação (TI)	Controlo	63±3	11±1	54±8	33±8	1,4±0,2	665±42
	Paprica	62±7	11,5±0,2	36±2	51±2	1,2±0,3	545,4±0,1
p-value (n=6)	T-Student	0.023	<0.001	0.023	<0.001	<0.001	<0.001
TP×TI (n=12)	p-value	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	0.034	<0.001

Os desvio-padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes, assim, não devem ser vistos como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de valores

Na **Tabela 3**, estão descritos os resultados da análise em fresco dos cheesecakes com paprica quando comparados com o controlo. No que concerne às coordenadas de cor, é possível perceber que a incorporação alterou significativamente as coordenadas de a^* e b^* , dando-lhe uma tonalidade mais verde (a^*) e amarela (b^*), sem mostrar alterações na luminosidade dos cheesecakes (L^*). Em relação à atividade da água houve uma interação significativa não permitindo tirar conclusões, mas em relação o pH, não havendo uma interação significativa, pode-se comprovar pelo “tamanho dos efeitos” que cada fator foi responsável por cerca de 20% das alterações, ainda que não se tenham encontrado diferenças significativas.

Tabela 3. Coordenadas de cor, atividade da água e pH de cheesecake com paprica

		L^*	a^*	b^*	aW	pH
Tempo Prateleira (TP)	0 Dias	89±6	1±4	21±7	0,983±0,006	4,45±0,03
	3 Dias	87±3	2±4	22±6	0,971±0,009	4,44±0,03
p-value (n=6)	T-Student	0.001	0.132	0.033	<0.001	0.174
Tipo Incorporação (TI)	Controlo	89±6	-2,4±0,2*	15±2*	0,983±0,006	5,0±0,9
	Paprica	87±3	5,5±0,3	27,3±0,8	0,970±0,008	4,44±0,03
p-value (n=6)	T-Student	0.003	<0.001	<0.001	<0.001	0.152
TP×TI (n=12)	p-value	<0.001	0.655	0.081	0.006	0.133

Em cada linha, um asterisco (*) representa uma diferença significativa, com um nível de significância de 0.05. Os desvio-padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes, assim, não devem ser vistos como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de valores.

Curcumina

Na **Tabela 4** está representada a composição centesimal dos cheesecakes com curcumina, onde mais uma vez não foram registadas alterações significativas em termos de valor nutricional entre o cheesecake com curcumina e o cheesecake controlo, por via das interações significativas registadas para todos os parâmetros. Contudo, na **Tabela 5**, apenas na atividade da água foram registadas alterações significativas. A partir das médias marginais estimadas (**Figura 9**), é possível verificar que o cheesecake incorporado com curcumina apresentou valores mais baixos de a^* (aumento da tonalidade verde), e mais altos de b^* (aumento de vermelho).

Tabela 4. Composição centesimal do cheesecake incorporado com curcumina, expressos em g/100g de mf.

		Humidade	Proteínas	Gordura	Hidratos de Carbono	Cinza	Kcal
Tempo	0 Dias	59±2	11,1±0,5	52±10	35±11	0,9±0,2	569±50
Prateleira (TP)	3 Dias	62±4	10,5±0,8	45±2	43±1	1,66±0,3	617±10
p-value (n=6)	T-Student	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Tipo	Controlo	63±3	11±1	54±8	33±8	0,9±0,2	665±42
Incorporação (TI)	Curcumina	57-6±0,7	10,9±0,3	43,1±0,1	44,7±0,6	1,66±0,3	610±2
p-value (n=6)	T-Student	<0.001	0.104	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
TP×TI (n=12)	p-value	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Os desvio-padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes, assim, não devem ser vistos como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de valores.

Tabela 5. Coordenadas de cor, atividade da água e pH de cheesecake com curcumina.

		L^*	a^*	b^*	aW	pH
Tempo	0 Dias	90±6	-5±3	26±12	0,983±0,005*	4,51±0,08
Prateleira (TP)	3 Dias	89±6	-5±3	16±10	0,972±0,007	5±1
p-value (n=6)	T-Student	0.042	0.071	0.898	<0,001	0.207
Tipo	Controlo	89±6	-2,4±0,2	15±12	0,983±0,06*	5±1
Incorporação (TI)	Curcumina	89±5	-7,8±5	36±12	0,972±0,007	4,51±0,07
p-value (n=6)	T-Student	0.587	<0.001	<0.001	<0.001	0.212
TP×TI (n=12)	p-value	<0.001	0.005	0.005	0.035	0.111

Em cada linha, um asterisco (*) representa uma diferença significativa, com um nível de significância de 0.05. Os desvio-padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes, assim, não devem ser vistos como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de valores.

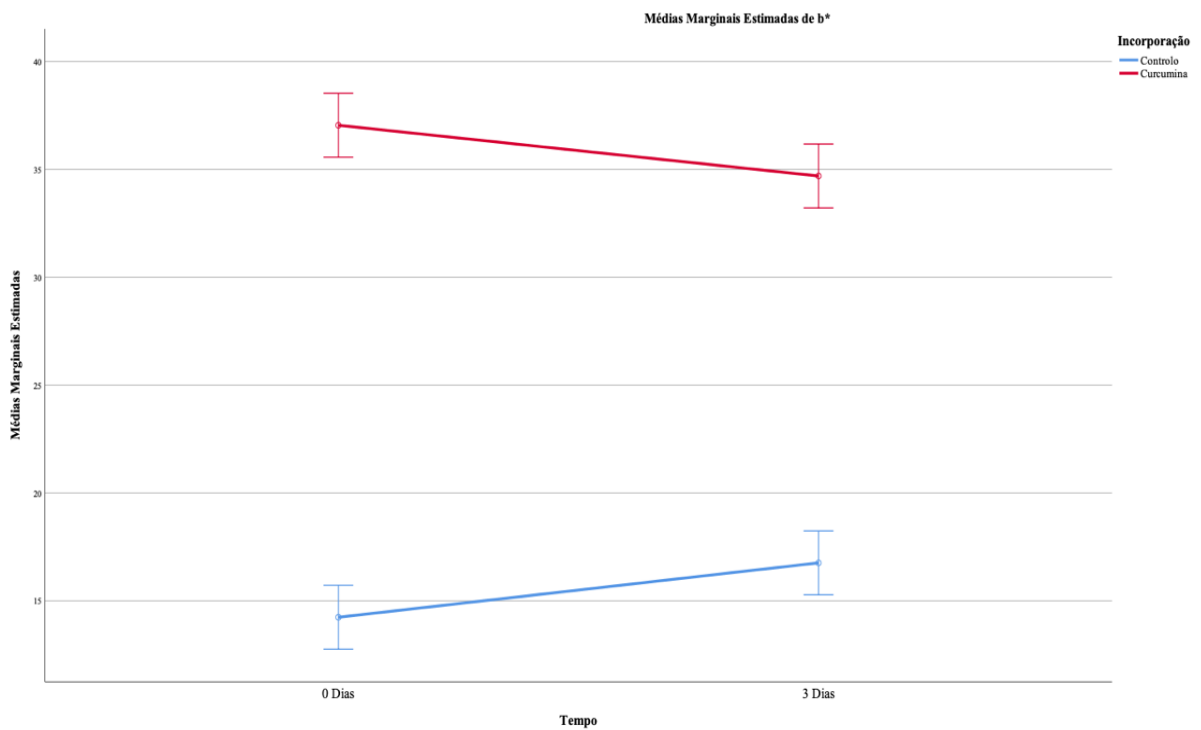
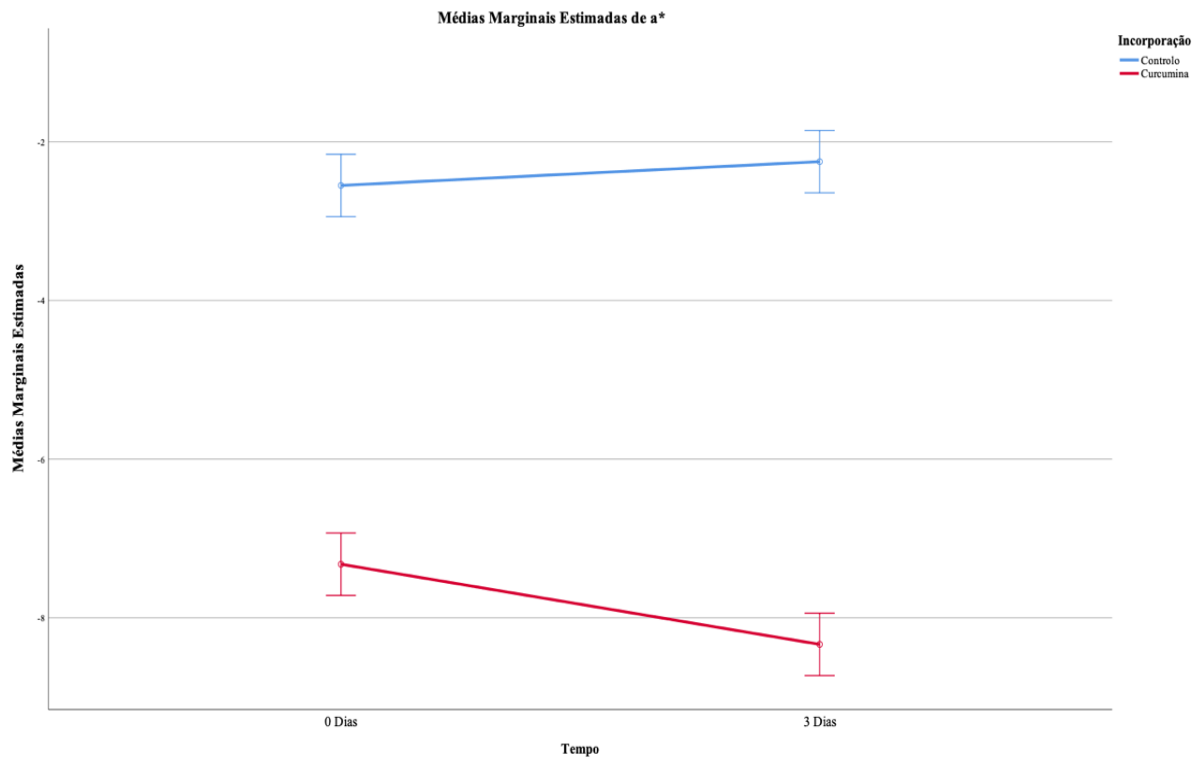


Figura 9. Médias marginais estimadas de a* e b* para o cheesecake incorporados com curcumina.

Amaranthus Caudatus L.

Nas **Tabelas 6 e 7** estão os resultados da incorporação de cheesecakes com extrato de *Amaranthus caudatus* L.. Mais uma vez, na **Tabela 6** são registadas interações significativas entre ambos os fatores, não permitindo obter conclusões significativas, mas consegue-se perceber que não foram registadas alterações significativas. Já na **Tabela 7** é possível perceber que o corante de *Amaranthus caudatus* L. incorporado nos cheesecakes apresentaram diferenças significativas novamente para as coordenadas de a* b*, mostrando um aumento de a* e redução de b*.

Tabela 6. Composição centesimal do cheesecake incorporado com *Amaranthus caudatus* L. expressos em g/100g de mf.

		Humidade	Proteínas	Gordura	Hidratos de Carbono	Cinza	Kcal
Tempo	0 Dias	59±2	11,2±0,4	48±14	39±14	1,25±0,08	638±72
Prateleira (TP)	3 Dias	63±4	10,2±0,5	42±5	46±5	1,4±0,3	604±24
p-value (n=6)	T-Student	0.002	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Tipo	Controlo	63±3	11±1	54±8	33±8	1,4±0,2	665±42
Incorporação (TI)	<i>Amaranthus caudatus</i> L.	58±2	10,8±0,2	36±1	51,7±0,8	1,2±0,1	581,8±0,2
p-value (n=6)	T-Student	<0.001	0.614	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
TP×TI (n=12)	p-value	0.140	0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Os desvio-padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes, assim, não devem ser vistos como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de valores.

Tabela 7. Coordenadas de cor, atividade da água e pH de cheesecake com *Amaranthus caudatus* L.

		L*	a*	b*	aW	pH
Tempo	0 Dias	88±8	8±12	9±1	0,983±0,06	4,45±0,03
Prateleira (TP)	3 Dias	83±1	5±8	12,0±0,5	0,971±0,08	5,0±0,9
p-value (n=6)	T-Student	<0.001	0.006	0.001	<0.001	0.158
Tipo	Controlo	89±6	-2,4±0,2*	15±1*	0,983±0,06	5,0±0,9
Incorporação (TI)	<i>Amaranthus caudatus</i> L.	81±1	16±4	6±1	0,971±0,08	4,45±0,01
p-value (n=6)	T-Student	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.165
TP×TI (n=12)	p-value	<0.001	0.345	0.931	0.045	0.147

Em cada linha, um asterisco (*) representa uma diferença significativa, com um nível de significância de 0.05. Os desvio-padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes, assim, não devem ser vistos como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de valores.

Considerando as utilizações dos corantes naturais em estudo nos cheesecakes, é possível constatar que todos eles cumpriram as suas funções de mudar a cor destas sobremesas, mantendo inalterados os parâmetros nutricionais. Este tipo de corante é desejável, pois é espectável que não haja alterações a mais nenhum aspeto do alimento após adição de corantes, sejam eles naturais ou artificiais. O pH e a atividade da água não foram afetados pela incorporação, mantendo-se praticamente inalterados, o que não aumenta o risco de contaminação por parte de microrganismos após a sua utilização.

5.2. Gelados

Paprica

Os mesmos corantes foram usados para incorporar gelados, estando os resultados apresentados nas **Tabelas 8 a 13**. Os macronutrientes mais abundantes nos gelados são os hidratos de carbono e a característica em fresco com maior expressão é a humidade. À semelhança das incorporações em cheesecakes, as incorporações em gelados não mostraram diferenças por via das interações significativas entre ambos os fatores (tempo de prateleira e tipo de incorporação) na composição centesimal.

Tabela 8. Composição centesimal de gelado incorporado com paprica, expressos em g/100g de mf.

		Humidade	Proteínas	Gordura	Hidratos de Carbono	Cinza	Kcal
Tempo de Prateleira (TP)	0 Days	65±3	11,9±0,8	28,75±0,09	58,1±0,8	1,28±0,09	538,6±0,1
	3 Days	67±1	11,2±0,1	34±2	53±12	1,4±0,2	564±9
	7 Days	68,1±0,5	11,6±0,3	47±6	39±6	1,59±0,04	630±31
	p-value (n=9)	T Student	<0.001	0.008	<0.001	<0.001	<0.001
Tipo Incorporação (TI)	Control	67±1	11,8±0,7	38±11	49±11	1,4±0,1	584±57
	Paprica	66±3	11,3±0,2	35±5	52±6	1,4±0,2	571±27
	p-value (n=6)	T Student	<0.001	0.006	0.002	<0.001	0.064
TP×TI (n=15)	p-value	<0.001	0.003	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Os desvio-padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes, assim, não devem ser vistos como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de valores.

No que concerne à cor externa (**Tabela 9**), foram detetadas interações significativas em L* e a*, bem como para aW e pH. Contudo, para b*, o tempo de prateleira mostrou um efeito significativo na cor do gelado, nomeadamente aumentando os tons azulados ao longo do tempo. É de salientar que o tempo mostrou um efeito mais importante do que a própria incorporação do corante paprica. Para ultrapassar este efeito, poderá ser

necessário adicionar mais quantidade de corante para conseguir uma tonalidade mais intensa.

Tabela 9. Coordenadas de cor, atividade da água e pH de gelado com paprica

		L*	a*	b*	aW	pH
Tempo de Prateleira (TP)	0 Days	82±6	2,4±0,9	27,0±0,6 ^a	0,974±0,02	6,8±0,1
	3 Days	79±10	3±2	29,1±0,4 ^b	0,980±0,001	6,61±0,3
	7 Days	83±2	3±1	31±1 ^c	0,983±0,002	6,64±0,02
p-value (n=9)	T Student	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Tipo Incorporação (TI)	Control	83±6	1,8±0,4	29±2	0,979±0,005	6,64±0,05
	Paprica	80±8	4,1±0,7	29±2	0,978±0,002	6,7±0,1
	T Student	0.001	<0.001	0.992	0.017	0.001
TP×TI (n=15)	<i>p</i> -value	<0.001	0.015	0.392	<0.001	0.002

Em cada linha, um asterisco (*), ou uma letra representam diferenças significativas usando o Teste T de Student ou Tukey, respetivamente, usando um nível de significância de 0.05. Os desvio-padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes, assim, não devem ser vistos como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de valores.

Curcumina

Em relação ao gelado com o corante natural de curcumina (**Tabela 10**), registaram-se interações significativas em todos os parâmetros do valor nutricional, à exceção da humidade, onde a passagem do tempo mostrou variações significativas, descendo ligeiramente durante os primeiros três dias, e subindo do terceiro até ao sétimo. Esta variação pode estar relacionada com alguma humidade que foi absorvida pelos gelados durante o armazenamento.

Tabela 10. Composição centesimal de gelado incorporado com curcumina, expressos em g/100g de mf.

		Humidade	Proteínas	Gordura	Hidratos de Carbono	Cinza	Kcal
Tempo de Prateleira (TP)	0 Dias	67,3±0,4 ^a	11,8±0,8	28,75±0,09	52±6	1,27±0,09	569±34
	3 Dias	66,4±0,8 ^a	11,5±0,4	29±3	58±2	1,23±0,05	543±14
	7 Dias	69±1 ^b	11,1±0,8	41±14	47±15	1,4±0,2	597±68
p-value (n=9)	T-Student	0.003	<0.001	0.004	<0.001	<0.001	<0.001
Tipo Incorporação (TI)	Controlo	67±1	11,8±0,7	38±11	49±11	1,4±0,1	584±57
	Curcumina	67±2	11,1±0,6	27,9±0,8	56±7	1,22±0,07	555±34
p-value (n=6)	T-Student	0.890	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
TP×TI (n=15)	<i>p</i> -value	0.165	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Em cada linha, uma letra representa diferenças significativas usando o Teste de Tukey, com um nível de significância de 0.05. Os desvio-padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes, assim, não devem ser vistos como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de valores.

Em relação aos valores de pH, aW e coordenadas de cor dos gelados com curcumina (**Tabela 11**), registados em todos interações significativas, não permitindo perceber qual o impacto de cada fator para os resultados obtidos. Nem pelas médias marginais estimadas ou pelo “tamanho dos efeitos” foi possível obter tendências, mostrando que a interação entre a incorporação e a passagem do tempo foram determinantes para que não se registassem diferenças significativas entre os gelados.

Tabela 11. Coordenadas de cor, atividade da água e pH de gelado com curcumina

		L*	a*	b*	aW	pH
Tempo de Prateleira (TP)	0 Dias	83±7	0,9±0,7	28±1	0,974±0,002	6,72±0,06
	3 Dias	88±1	1,5±0,5	33±5	0,980±0,002	6,59±0,02
	7 Dias	78±5	1,5±0,5	27±5	0,982±0,002	6,64±0,05
p-value (n=9)	T-Student	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Tipo Incorporação (TI)	Controlo	83±6	1,8±0,4	29±2	0,979±0,005	6,64±0,05
	Curcumina	83±8	4±5	30±7	0,978±0,002	6,65±0,09
p-value (n=6)	T-Student	0.224	<0.001	0.279	0.234	0.362
TP×TI (n=15)	p-value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.012

Os desvio-padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes, assim, não devem ser vistos como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de valores.

Amaranthus caudatus L.

Finalmente, para o gelado incorporado com corante extraído de *Amaranthus caudatus L.* (**Tabela 12**), voltaram-se a registar diferenças significativas na humidade durante o tempo de armazenamento, seguindo a mesma tendência que o gelado incorporado com curcumina. De forma semelhante, em mais nenhum componente foram registadas diferenças significativas.

Tabela 12. Composição centesimal de gelado incorporado com *Amaranthus caudatus* L. expresso em g/100g de mf

		Humidade	Proteínas	Gordura	Hidratos de Carbono	Cinza	Kcal
Tempo de Prateleira (TP)	0 Dias	68,0±0,2 ^a	11,9±0,8	36±8	51±7	1,28±0,08	575±41
	3 Dias	67±1 ^b	11,3±0,2	27±6	61±6	1,23±0,04	529±28
	7 Dias	68,1±0,4 ^a	11,0±0,8	40±15	48±15	1,65±0,08	591±74
p-value (n=9)	T-Student	0.025	0.001	0.034	0.001	0.001	<0.001
Tipo Incorporação (TI)	Controlo	67±1	11,8±0,7	38±11	49±11	1,4±0,1	584±57
	<i>Amaranthus caudatus</i> L.	67,8±0,5	10,9±0,5	30±10	57±10	1,4±0,2	546±50
p-value (n=6)	T-Student	0.326	<0.001	0.002	<0.001	0.403	<0.001
TP×TI (n=15)	p-value	0.236	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Em cada linha, uma letra representa diferenças significativas usando o Teste de Tukey, com um nível de significância de 0.05. Os desvio-padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes, assim, não devem ser vistos como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de valores.

Em relação à cor dos gelados com *Amaranthus caudatus* L. (**Tabela 13**), registaram-se dois casos de interação significativa entre os fatores, registados para as coordenadas de L* e aW. Na coordenada a* e b*, mas também no pH, puderam-se quantificar os efeitos de cada fator. Na coordenada a*, a incorporação mostrou um efeito significativo, mostrando um aumento da tonalidade vermelha após incorporação da AC, mas uma redução significativa de b* (azul). Quanto ao pH, a incorporação de AC aumentou de forma significativa o pH de 6.6 para 6.8, contudo a passagem do tempo também mostrou efeito redutor de pH. Assim, a incorporação de AC parece ter alguns efeitos no pH do gelado ao mesmo tempo que mostra grande capacidade para corar o gelado.

Tabela 13. Coordenadas de cor, atividade da água e pH de gelado com *Amaranthus caudatus* L..

		L*	a*	b*	aW	pH
Tempo de Prateleira (TP)	0 Dias	76,8±0,7	6±4	24±4 ^a	0,976±0,003	6,75±0,003 ^a
	3 Dias	83±6	5±4	24±5 ^a	0,980±0,002	6,7±0,1 ^a
	7 Dias	83±2	6±4	27±5 ^b	0,982±0,002	6,70±0,07 ^a
p-value (n=9)	T-Student	<0.001	0.309	0.003	<0.001	0.022
Tipo Incorporação (TI)	Controlo	83±6	1,8±0,4*	29±2*	0,979±0,005	6,64±0,05*
	<i>Amaranthus caudatus</i> L.	81±5	9,5±0,8	21±1	0,979±0,001	6,79±0,03
p-value (n=6)	T-Student	<0.001	<0.001	<0.001	0.390	<0.001
TP×TI (n=15)	p-value	<0.001	0.458	0.165	<0.001	0.227

Em cada linha, um asterisco (*), ou uma letra representam diferenças significativas usando o Teste T de Student ou Tukey, respetivamente, usando um nível de significância de 0.05. Os desvio-padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes, assim, não devem ser vistos como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de valores.

5.3. Manteigas

O último alimento incorporado com corantes foi manteiga, cujos resultados estão representados nas **Tabelas 14 a 19**, revelam que a gordura seguida dos hidratos de carbono são os macronutrientes mais abundantes neste alimento. No caso do valor nutricional, foram detetadas interações significativas em todos os nutrientes à exceção das proteínas, onde parecem ter-se reduzido com a incorporação da paprica e aumentado ao longo do tempo. Este comportamento pode ser devido à perda de humidade ao longo do tempo.

Paprika

Tabela 14. Composição centesimal de manteigas incorporadas com paprica, expressos em g/100g de mf.

		Humidade	Proteínas	Gordura	Hidratos de Carbono	Cinza	Kcal
Tempo Prateleira (TP)	0 Dias	38±7	2,4±0,3*	50±19	47±19	0,5±0,1	649±96
	3 Dias	64±37	2,9±0,1	68±4	29±5	0,25±0,06	737±21
	<i>p</i> -value (n=6)	T-Student	<0.001	0.036	<0.001	<0.001	<0.001
Tipo Incorporação (TI)	Controlo	71±30	3,0±0,2*	50±19	45±21	0,38±0,08	659±107
	Paprica	30±1	2,3±0,2	68±4	32±2	0,4±0,2	727±11
	<i>p</i> -value (n=6)	T-Student	<0.001	0.009	<0.001	<0.001	0.090
TP×TI (n=12)	<i>p</i> -value	<0.001	0.538	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Em cada linha, um asterisco (*) representa uma diferença significativa, com um nível de significância de 0.05. Os desvio-padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes, assim, não devem ser vistos como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de valores.

Na **Tabela 15**, que mostra as coordenadas de cor, aW e pH, foram registadas interações significativas em todos os parâmetros, à exceção da coordenada a*, onde a incorporação de paprica aumentou significativamente a cor vermelha da manteiga. Através das médias marginais estimadas (**Figura 10**), foi possível verificar que a paprika reduziu a luminosidade (L*) da manteiga, bem como aumentar as coordenadas b*, a cor amarela.

Tabela 15. Coordenadas de cor, atividade da água, pH da manteiga com paprica.

		L*	a*	b*	aW	pH
Tempo	0 Dias	89±5	0±2	25±5	0,990±0,001	4,04±0,08
Prateleira (TP)	3 Dias	90±4	0±2	24±5	0,969±0,009	4,07±0,05
p-value (n=6)	T-Student	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.024
Tipo Incorporação (TI)	Controlo	93,7±0,2	-2,6±0,1*	20,1±0,4	0,984±0,007	4,00±0,03
	Paprica	85±8	1,7±0,1	29,1±0,8	0,974±0,01	4,11±0,02
p-value (n=6)	T-Student	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
TP×TI (n=12)	p-value	<0.001	0.114	<0.001	<0.001	0.024

Em cada linha, um asterisco (*) representa uma diferença significativa, com um nível de significância de 0.05. Os desvio-padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes, assim, não devem ser vistos como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de valores.

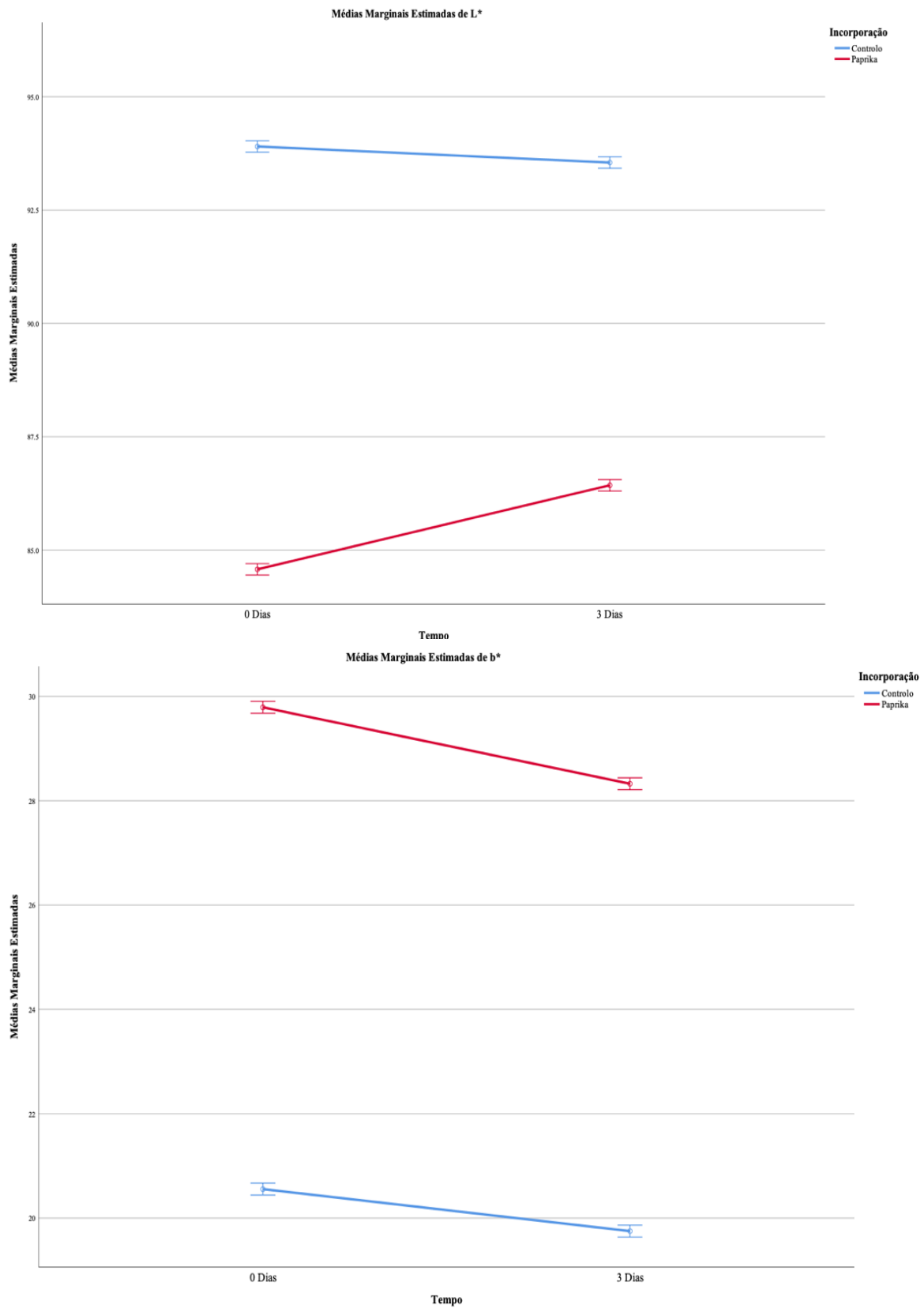


Figura 10. Médias marginais estimadas de L* e b* para a manteiga incorporada com paprika.

Curcumina

Os valores da composição centesimal da curcumina estão representados na **Tabela 16**, onde mais uma vez as proteínas foram afetadas pelo tempo de prateleira, mostrando um aumento significativo. Os outros parâmetros nutricionais mostraram interações significativas, não permitindo tirar conclusões significativas.

Tabela 16. Composição centesimal de manteiga incorporada com curcumina, expressos em g/100g de mf.

		Humidade	Proteínas	Gordura	Hidratos de Carbono	Cinza	Kcal
Tempo Prateleira (TP)	0 Dias	45±1	2,6±0,1*	41±9	56±9	0,44±0,04	604±47
	3 Dias	78±21	3,4±0,5	65±7	31±7	0,23±0,08	725±35
p-value (n=6)	T-Student	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Tipo Incorporação (TI)	Controlo	71±29	3,0±0,5	52±21	44±21	0,38±0,08	659±106
	Curcumina	52±7	3,0±0,5	54±5	38,0±0,5	0,3±0,1	669±24
p-value (n=6)	T-Student	<0.001	0.970	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
TP×TI (n=12)	p-value	<0.001	0.606	<0.001	<0.001	0.016	<0.001

Em cada linha, um asterisco (*) representa uma diferença significativa, com um nível de significância de 0.05. Os desvio-padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes, assim, não devem ser vistos como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de valores.

Na **Tabela 17** estão representadas as coordenadas da manteiga incorporada com curcumina, o pH e aW, onde é possível perceber que a incorporação aumentou significativamente o pH. Para as cores exteriores, foram detetadas interações significativas, não permitindo tirar conclusões, ainda que seja possível perceber que houve alterações induzidas pela adição de curcumina, pela redução de a* e aumento de b*.

Tabela 17. Coordenadas de cor, atividade da água e pH da manteiga com curcumina.

		L*	a*	b*	aW	pH
Tempo	0 Dias	93±1	-4±1	23±3	0,991±0,002	4,1±0,1
Prateleira (TP)	3 Dias	94,2±0,7	-4±1	24±4	0,97±0,01	4,1±0,1
p-value (n=6)	T-Student	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Tipo Incorporação (TI)	Controlo	93,7±0,2	-2,6±0,1	20,1±0,4	0,984±0,007	3,99±0,03*
	Curcumina	93±1	-5,2±0,3	26,7±0,9	0,97±0,01	4,24±0,03
p-value (n=6)	T-Student	<0.001<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
TP×TI (n=12)	p-value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.667

Em cada linha, um asterisco (*) representa uma diferença significativa, com um nível de significância de 0.05. Os desvio-padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes, assim, não devem ser vistos como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de valores.

Amaranthus caudatus L.

Finalmente, nas **Tabelas 18 e 19** estão representados os valores nutricionais e de cores da incorporação de *Amaranthus caudatus L.* na manteiga. Ao nível da composição centesimal, mais uma vez, não foram detetadas diferenças significativas entre as amostras, ao mesmo tempo que se detetaram interações significativas entre os dois fatores (tempo e incorporação). À semelhança da incorporação de curcumina, também na da *AC* registaram-se subidas de pH, enquanto nas cores não se conseguiram definir os efeitos de cada fator, ainda que tenha havido alterações de cores, contudo resultaram das interações entre ambos os fatores.

Tabela 18. Composição centesimal de manteiga incorporada com *Amaranthus caudatus L.*, expressos em g/100g de mf.

		Humidade	Proteínas	Gordura	Hidratos de Carbono	Cinza	Kcal
Tempo Prateleira (TP)	0 Dias	37±8	2,5±0,2	57±27	40±27	0,49±0,05	685±136
	3 Dias	63±38	3,0±0,6	62±10	35±11	0,24±0,08	709±50
p-value (n=6)	T-Student	<0.001	0.088	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Tipo Incorporação (TI)	Controlo	71±29	3,0±0,6	52±21	44±21	0,38±0,08	659±136
	<i>Amaranthus caudatus L.</i>	29,0±0,99	2,5±0,1	67±16	30±16	0,3±0,2	737±80
p-value (n=6)	T-Student	<0.001	0.051	<0.001	<0.001	0.123	<0.001
TP×TI (n=12)	p-value	<0.001	0.285	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Em cada linha, um asterisco (*) representa uma diferença significativa, com um nível de significância de 0.05. Os desvio-padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes, assim, não devem ser vistos como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de valores.

Considerando as incorporações das três plantas na manteiga, registaram-se algumas alterações ligeiras nas proteínas, mas poucas diferenças significativas na cor, o que pode acontecer por causa da manteiga já ter uma cor alaranjada, o que dificulta a capacidade de colorir, sobretudo usando corantes com gamas de cores semelhantes à cor da manteiga.

Tabela 19. Coordenadas de cor, atividade da água e pH da manteiga incorporada com *Amaranthus caudatus* L..

		L*	a*	b*	aW	pH
Tempo	0 Dias	84±10	6±10	17±4	0,991±0,001	4,05±0,09
Prateleira (TP)	3 Dias	87±8	6±9	17±3	0,969±0,001	4,09±0,07
p-value (n=6)	T-Student	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.007
Tipo	Controlo	93,7±0,2	-2,6±0,1	20,1±0,4	0,984±0,007	3,99±0,03*
Incorporação (TI)	<i>Amaranthus caudatus</i> L.	77±3	14,6±0,7	13,9±0,7	0,97±0,15	4,14±0,02
p-value (n=6)	T-Student	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
TP×TI (n=12)	p-value	<0.001	0.302	0.150	<0.001	0.210

Em cada linha, um asterisco (*) representa uma diferença significativa, com um nível de significância de 0.05. Os desvio-padrão foram calculados a partir de resultados obtidos em condições diferentes, assim, não devem ser vistos como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de valores.

5.4. Análise sensorial

Os resultados obtidos relativos à análise sensorial das amostras em estudo encontram-se expressos na **Tabela 22**. Verificou-se que na população-alvo, a cor rosa (AC) aparece, de modo geral, como a cor com melhor avaliação, destacando-se ainda a doçura no “cheesecake” e no gelado. Adicionalmente, o cheesecake foi mencionado pela sua melhor aparência quando corado com extrato de AC, apresentando-se ainda como a amostra com melhor odor entre as amostras em estudo. A cor amarela (curcumina) foi mencionada como a mais apelativa, nomeadamente nas amostras de gelado. Já a cor laranja (paprica) destaca-se pela persistência do sabor e pelo seu odor mais intenso nos três tipos de amostras em estudo.

Tabela 20. Preferências na cor, características de sabor, olfativas e aspeto geral.

	Cheesecake		Manteiga		Gelado	
	n	%	n	%	n	%
Qual é o mais doce?						
Rosa	26	72.2	9	25.0	31	86.1
Cor de Laranja	4	11.1	17	47.2	3	8.3
Amarelo	6	16.7	10	27.8	2	5.6
Qual é o que tem sabor mais persistente?						
Rosa	12	33.3	3	8.3	9	25
Cor de Laranja	16	44.4	23	63.9	21	58.3
Amarelo	8	22.2	10	27.8	6	16.7
Qual é o mais amargo?						
Rosa	1	2.8	1	2.8	0	0
Cor de Laranja	21	61.1	22	61.1	23	63.9
Amarelo	14	38.9	13	36.1	13	36.1
Qual é o que tem um odor mais intenso?						
Rosa	12	33.4	8	22.2	12	33.3
Cor de Laranja	19	52.8	21	58.3	20	55.6
Amarelo	5	13.9	7	19.4	4	11.1
Qual é que tem um odor mais desagradável?						
Rosa	3	8.3	15	41.7	21	58.3
Cor de Laranja	23	63.9	14	38.9	13	36.1
Amarelo	10	27.8	7	19.4	2	5.6
Qual é o que tem melhor aparência?						
Rosa	35	97.2	8	22.2	7	19.4
Cor de Laranja	1	2.8	21	58.3	1	2.8
Amarelo	0	0	7	19.4	28	77.8

Caracterização sociodemográfica da população amostra

Os resultados relativos à avaliação sociodemográfica da população-alvo (36 inquiridos) apresentam-se descritos na **Tabela 23**.

Tabela 21. Caracterização da amostra.

	N	%
Sexo (n=36)		
Feminino	24	66,7
Masculino	12	33,3
Escalões etários (n=36)		
Até 35 anos	13	36,1
36 a 50 anos	13	36,1
Mais de 50 anos	10	27,8
Qual o seu tipo de alimentação? (n=36)		
Dieta Normal	30	83,3
Vegetariana	6	16,7
É alérgico a algum alimento? (n=36)		
Não	31	86,1
Sim	5	13,9
É consumidor de doçaria? (n=36)		
Não	10	27,8
Sim	26	72,2
Se sim, qual a frequência? (n=26)		
Raramente	2	5,6
2 vezes por mês	1	2,8
3 vezes por mês	1	2,8
1 vez por semana	11	30,6
2 vezes por semana	3	8,3
3 vezes por semana	4	11,1
Diariamente	4	11,1
Sabe o que são aditivos naturais? (n=36)		
Não	14	38,9
Sim	22	61,1
Se sim, diga algum (n=7)		
Açafrão	3	33,3
Canela	2	22,2
Beterraba	2	22,2
Cúrcuma	1	11,1
Mel	1	11,1
Se sim, diga a sua função (n=13)		
Conservante	5	38,5
Vitamina	2	15,4
Corante	2	15,4
Antioxidante	3	23,1
Adoçante natural	1	7,7
Idade – Média 41,97 anos (DP 12,41); Min: 21; Max: 24		

Dentre a população inquirida, a maioria é do sexo feminino (66.7%), com uma média etária de 41.97±12.41 anos. Relativamente aos hábitos alimentares, verifica-se que a grande maioria (83.3%) tem uma dieta normal, sendo os restantes 16.7% vegetarianos. Quando questionados relativamente a alergias alimentares, apenas 5 dos inquiridos responderam afirmativamente, sendo essas alergias relacionadas com alimentos como camarão, kiwi, ananás, frutos secos, lactose e morangos. Verificou-se ainda que 72.2% dos inquiridos são consumidores de doçaria, sendo o seu consumo relativamente frequente (61.1% consome no mínimo uma vez por semana).

Na **Figura 9** podemos verificar que 61.1% da amostra referiu saber o que eram aditivos naturais, e as respostas mais referidas fora: ser algo de origem natural, extraído de um produto natural, algo que tem propriedade específicas e/ou benéficas.

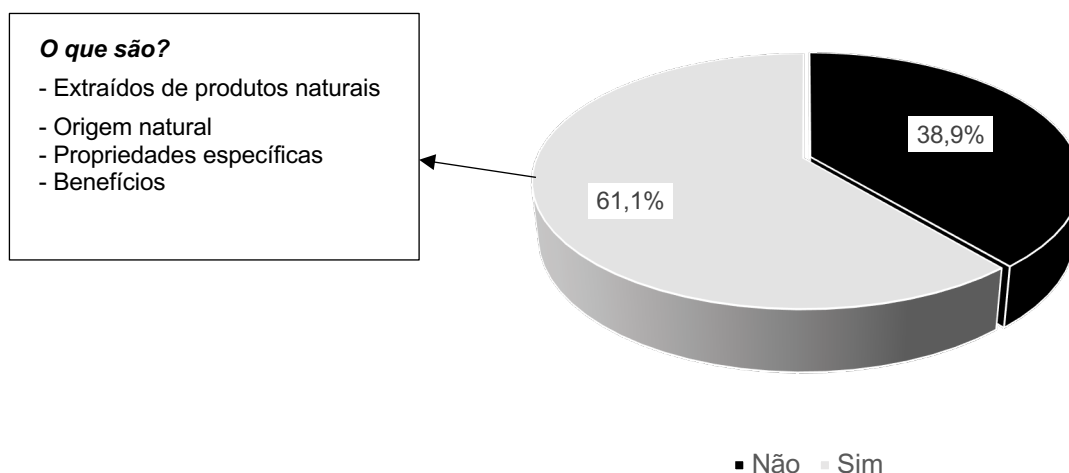


Figura 11. Sabe o que são aditivos naturais?

Através da **Tabela 24**, é possível inferir que a maior parte dos inquiridos compraria algum dos produtos que provou (61.1%), sendo que o cheesecake rosa (corante extraído da AC) e a manteiga cor-de-laranja (paprica) são os produtos com maior predisposição para compra.

Tabela 22. Comportamento de compra.

	n	%
Compraria algum destes produtos que provou? (n=36)		
Não	14	38.9
Sim	22	61.1
Se sim. qual ou quais compraria? (n=22)		
Cheesecake Rosa	8	36.4
Manteiga cor-de-laranja	5	22.7
Gelado Rosa	3	13.6
Gelado Amarelo	3	13.6
Manteiga Rosa	2	9.1

De acordo com os dados expressos na **Tabela 25**, verifica-se que existe uma relação estatisticamente significativa entre o sexo dos inquiridos e a avaliação das cores e na intensidade do odor do cheesecake, existindo uma percentagem significativamente

superior de menções ao cor-de-laranja no sexo masculino. Embora sem significância estatística, há que salientar que o gelado de cor rosa é mais frequentemente mencionado pelos inquiridos do sexo masculino como a sobremesa que tem um odor mais desagradável.

Em contraste, a análise da influência da idade na avaliação de cores, mostra que não existe uma relação estatisticamente significativa entre estas variáveis (**Tabela 26**), salientando-se apenas o gelado de cor rosa como o menos mencionado nos inquiridos de idade superior a 50 anos.

Já os resultados expressos na **Tabela 27** indiciam a existência de duas relações estatisticamente significativas entre o consumo de doçaria e a avaliação das cores: nas amostras de gelado, os consumidores de doçaria mencionam que o sabor mais persistente corresponde ao cor-de-laranja; por outro lado, os que não consomem doçaria mencionam um sabor mais proeminente no gelado amarelo. Relativamente à aparência das amostras, os consumidores de doçaria tendem a apontar o gelado amarelo como o mais atraente entre as amostras em estudo.

Tabela 23. Preferência de cor consoante género

GÉNERO	Cheesecake					Manteiga					Gelado				
	Feminino		Masculino		p	Feminino		Masculino		p	Feminino		Masculino		p
	n	%	n	%		n	%	n	%		n	%	n	%	
Qual é o mais doce?															
Rosa	16	66.7%	10	83.3%	0.392	7	29.2%	2	16.6%	0.291	20	73.4%	11	91.7%	0.648
Cor de Laranja	4	16.7%	0	0%		9	37.5%	8	66.7%		2	8.3%	1	8.3%	
Amarelo	4	16.7%	2	16.7%		8	33.3%	2	16.7%		2	8.3%	0	0%	
Qual é o que tem sabor mais persistente?															
Rosa	8	33.3%	4	33.3%	0.310	2	8.3%	1	8.3%	0.965	6	25%	3	25%	0.617
Cor de Laranja	9	37.5%	7	58.3%		15	32.5%	8	66.7%		13	54.2%	8	66.7%	
Amarelo	7	29.2%	1	8.3%		7	29.2%	3	25%		5	20.8%	1	8.3%	
Qual é o mais amargo?															
Rosa	1	4.2%	0	0%	0.211	1	4.2%	0	0%	0.401	0	0%	0	0%	0.273
Cor de Laranja	16	66.7%	5	41.7%		16	66.7%	6	50%		14	58.3%	9	75%	
Amarelo	7	29.2%	7	58.3%		7	29.2%	6	50%		10	41.7%	3	25%	
Qual é o que tem um odor mais intenso?															
Rosa	11	45.9%	1	8.3%	<0.05	4	16.7%	4	33.3%	0.526	7	29.2%	5	41.7%	0.301
Cor de Laranja	8	33.3%	11	91.7%		15	62.5%	6	50%		13	54.2%	7	58.3%	
Amarelo	5	20.8%	0	0%		5	20.8%	2	16.7%		4	16.7%	0	0%	
Qual é o que tem um odor mais desagradável?															
Rosa	2	8.3%	1	8.3%	0.811	10	41.7%	5	41.7%	0.948	11	45.8%	10	83.3%	0.090
Cor de Laranja	16	66.7%	7	58.3%		9	37.5%	5	41.7%		11	45.8%	2	16.7%	
Amarelo	6	25%	4	33.3%		5	20.8%	2	16.7%		2	8.3%	0	0%	
Qual é o que tem melhor aparência?															
Rosa	24	100%	11	91.7%	0.333	6	25%	2	16.7%	0.765	6	25%	1	8.3%	0.200
Cor de Laranja	0	0%	1	8.3%		14	58.3%	7	58.3%		0	0%	1	8.3%	
Amarelo	0	0%	0	0%		4	16.7%	3	25%		18	75%	10	83.3%	

Tabela 24. Preferência de cor consoante a idade

ESCALÕES ETÁRIOS	Cheesecake							Manteiga							Gelado						
	Até 35 anos		36 a 50 anos		Mais de 50 anos		p	Até 35 anos		36 a 50 anos		Mais de 50 anos		p	Até 35 anos		36 a 50 anos		Mais de 50 anos		p
	n	%	n	%	n	%		n	%	n	%	n	%		n	%	n	%	n	%	
Qual é o mais doce?																					
Rosa	9	66.2%	12	92.3%	5	50.0%	0.062	2	15.4%	6	46.2%	1	10.0%	0.197	12	92.3%	11	84.6%	8	80.0%	0.807
Cor de Laranja	0	0.0%	1	7.7%	3	30.0%		8	61.5%	5	38.5%	4	40.0%		1	7.7%	1	7.7%	1	10.0%	
Amarelo	4	30.8%	0	0.0%	2	20.0%		3	23.1%	2	15.4%	5	50.0%		0	0.0%	1	7.7%	1	10.0%	
Qual é o que tem sabor mais persistente?																					
Rosa	2	15.4%	7	53.8%	3	30.0%	0.135	0	0.0%	3	23.1%	0	0.0%	0.215	2	15.4%	5	38.5%	2	20.0%	0.368
Cor de Laranja	8	61.5%	5	38.5%	3	30.0%		9	69.2%	7	53.8%	7	70.0%		7	53.8%	7	53.8%	7	70.0%	
Amarelo	3	23.1%	1	7.7%	4	40.0%		4	30.8%	3	23.1%	3	30.0%		4	30.8%	1	7.7%	1	10.0%	
Qual é o mais amargo?																					
Rosa	0	0.0%	1	7.7%	0	0.0%	0.691	0	0.0%	1	7.7%	0	0.0%	0.701	10	76.9%	7	53.8%	6	60.0%	0.451
Cor de Laranja	7	53.8%	8	61.5%	6	60.0%		9	69.2%	7	53.8%	6	60.0%		3	23.1%	6	46.2%	4	40.0%	
Amarelo	6	46.2%	4	30.8%	4	40.0%		4	30.8%	5	38.5%	4	40.0%		0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	
Qual é o que tem um odor mais intenso?																					
Rosa	4	30.8%	6	38.5%	3	30.0%	0.562	2	15.4%	4	30.8%	2	20.0%	0.746	7	53.8%	4	30.8%	1	10.0%	0.077
Cor de Laranja	8	61.5%	7	53.8%	4	40.0%		8	61.5%	6	46.2%	7	70.0%		6	46.2%	8	61.5%	6	60.0%	
Amarelo	1	7.7%	1	7.7%	3	30.0%		3	23.1%	3	23.1%	1	10.0%		0	0.0%	1	7.7%	3	30.0%	
Qual é que tem um odor mais desagradável?																					
Rosa	2	15.4%	1	7.7%	0	0.0%	0.653	6	46.2%	6	46.2%	3	30.0%	0.468	7	53.8%	9	69.2%	5	50.0%	0.622
Cor de Laranja	8	61.5%	9	69.2%	6	60.0%		6	46.2%	3	23.1%	5	50.0%		6	46.2%	3	23.1%	4	40.0%	
Amarelo	3	23.1%	3	23.1%	4	40.0%		1	7.7%	4	30.8%	2	20.0%		0	0.0%	1	7.7%	1	10.0%	
Qual é o que tem melhor aparência?																					
Rosa	12	92.3%	13	100.0%	10	100.0%	0.899	4	30.8%	3	23.1%	1	10.0%	0.447	3	23.1%	2	15.4%	2	20.0%	0.703
Cor de Laranja	1	7.7%	0	0.0%	0	0.0%		7	53.8%	6	46.2%	8	80.0%		1	7.7%	0	0.0%	0	0.0%	
Amarelo	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%		2	15.4%	4	30.8%	1	10.0%		9	69.2%	11	84.6%	8	80.0%	

Tabela 25. Avaliação da cor consoante as características organoléticas

É CONSUMIDOR DE DOÇARIA?	Cheesecake					Manteiga					Gelado				
	Não		Sim		p	Não		Sim		p	Não		Sim		p
	n	%	n	%		n	%	n	%		n	%	n	%	
Qual é o mais doce?															
Rosa	7	70.0%	19	73.0%	0.920	1	10.0%	8	30.7%	0.567	8	80.0%	23	88.4%	0.815
Cor de Laranja	1	10.0%	3	11.5%		6	60.0%	11	42.3%		1	10.0%	2	7.7%	
Amarelo	2	20.0%	4	15.5%		3	30.0%	7	26.9%		1	10.0%	1	3.8%	
Qual é o que tem sabor mais persistente?															
Rosa	3	30.0%	9	34.6%	0.785	0	0.0%	3	11.50%	0.533	3	30.0%	6	23.1%	<0.05
Cor de Laranja	4	40.0%	12	46.2%		7	70.0%	16	61.50%		2	20.0%	19	73.1%	
Amarelo	3	30.0%	5	19.2%		3	30.0%	7	26.90%		5	50.0%	1	3.8%	
Qual é o mais amargo?															
Rosa	0	0.0%	1	3.8%	0.821	0	0.0%	1	3.80%	0.800	7	70.0%	16	61.5%	0.473
Cor de Laranja	6	60.0%	15	57.7%		6	60.0%	16	61.50%		3	30.0%	10	38.5%	
Amarelo	4	40.0%	10	0%		4	40.0%	9	34.60%		0	0.0%	0	0.0%	
Qual é o que tem um odor mais intenso?															
Rosa	3	30.0%	9	34.6%	0.946	2	20.0%	6	23.10%	0.980	3	30.0%	9	34.6%	0.946
Cor de Laranja	6	60.0%	13	50.0%		6	60.0%	15	57.70%		6	60.0%	14	53.8%	
Amarelo	1	10.0%	4	15.4%		2	20.0%	5	19.20%		1	10.0%	3	11.5%	
Qual é o que tem um odor mais desagradável?															
Rosa	6	60.0%	15	57.7%	0.879	3	30.0%	12	46.20%	0.535	6	60.0%	15	57.7%	0.659
Cor de Laranja	4	40.0%	9	34.6%		4	40.0%	10	38.50%		4	40.0%	9	34.6%	
Amarelo	0	0.0%	2	7.7%		3	30.0%	4	15.40%		0	0.0%	2	7.7%	
Qual é o que tem melhor aparência?															
Rosa	1	10.0%	2	7.7%	0.546	3	30.0%	5	19.20%	0.762	4	40.0%	3	11.5%	<0.05
Cor de Laranja	5	50.0%	18	69.2%		5	50.0%	16	61.50%		1	10.0%	0	0.0%	
Amarelo	4	40.0%	6	23.1%		2	20.0%	5	19.20%		5	50.00%	23	88.5%	

6. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS

Tendo em conta a elevada procura por produtos alimentares incorporados com corantes naturais em alternativa ao uso de corantes artificiais, este estudo contribuiu para aprofundar o conhecimento relativamente à estabilidade dos ingredientes corantes em estudo, uma vez que foram capazes de corar os alimentos em estudo (manteiga, gelado e cheesecake) e foram ainda capazes de manter a coloração dos alimentos ao longo do tempo de prateleira.

A incorporação destes ingredientes não afetou significativamente as características organoléticas dos produtos, uma mais-valia importante, uma vez que os aditivos adicionados aos alimentos não devem causar alterações neste sentido, nem afetar a composição dos alimentos. Relativamente às características físicas, os valores de pH e aW também não sofreram alterações significativas. Estes resultados são promissores, uma vez que variações no pH nos alimentos estão usualmente associadas a alterações de textura e outras características organoléticas que devem ser evitadas na investigação de novos aditivos alimentares.

Relativamente à análise sensorial realizada na população-alvo, 2/3 referiram poder vir a adquirir pelo menos um dos produtos alimentares em estudo, sendo estes resultados pouco significativos dada a reduzida amostra populacional.

Assim, foi possível desenvolver com sucesso três produtos distintos coloridos com corante amarelo, laranja e cor-de-rosa, sem impacto negativo nos produtos finais, realçando o seu potencial corante e aplicabilidade na indústria alimentar. A validação do uso destes corantes a nível industrial será conseguida através das análises microbiológicas que se encontram em curso e ainda através da sua aplicação noutras matrizes alimentares, nomeadamente noutros produtos de pastelaria.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dikshit R, Tallapragada P. Comparative study of natural and artificial flavoring agents and dyes. *Nat Artificial Flavor Agents Food Dye Handb Food Bioeng.* 2018;7:83–111.
2. Agócs A, Deli J. Pigments in your food. *J Food Compos Anal.* 2011;24(6):757–9.
3. Oplatońska-Stachowiak M, Elliott CT. Food colors: Existing and emerging food safety concerns. *Crit Rev Food Sci Nutr [Internet].* 2017;57(3):524–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2014.889652>
4. Martins N, Roriz CL, Morales P, Barros L, Ferreira ICFR. Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends Food Sci Technol.* 2016;52:1–15.
5. Alvarez Gaona IJ, Fanzone M, Sari S, Assof M, Pérez D, Chirife J, et al. Spray-dried Ancellotta red wine: natural colorant with potential for food applications. *Eur Food Res Technol.* 2019;245(12):2621–30.
6. Delgado-Vargas F, Paredes-López O. Natural colorants for food and nutraceutical uses. *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses.* 2002.
7. Pires TCSP, Dias MI, Barros L, Barreira JCM, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR. Incorporation of natural colorants obtained from edible flowers in yogurts. *Lwt [Internet].* 2018;97:668–75. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.013>
8. I.C.M. F, A.L.A.L. P, A.M.R. C, B.A.L.A. M, L.F.D. Al, Y.W C, et al. Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. *Rev Bras Plantas Med.* 2014;
9. Bouarab Chibane L, Degraeve P, Ferhout H, Bouajila J, Oulahal N. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *J Sci Food Agric.* 2019;99(4):1457–74.
10. Joint FAO/OMS Expert Committee on Food Additives. *Manual de Procedimiento CODEX ALIMENTARIUS.* Fao/Oms. 2010;
11. Carochio M, Morales P, Ferreira ICFR. Natural food additives: Quo vadis? *Trends Food Sci Technol.* 2015;45(2):284–95.
12. Rodriguez-Amaya DB. Natural food pigments and colorants. *Curr Opin Food Sci [Internet].* 2016;7:20–6. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2015.08.004>
13. Feketea G, Tsabouri S. Common food colorants and allergic reactions in children: Myth or reality? *Food Chem.* 2017;230:578–88.
 14. Lourenço SC, Moldão-Martins M, Alves VD. Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules.* 2019;24(22):14–6.
 15. Ng KR, Lyu X, Mark R, Chen WN. Antimicrobial and antioxidant activities of phenolic metabolites from flavonoid-producing yeast: Potential as natural food preservatives. *Food Chem [Internet].* 2019;270(April 2018):123–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.077>
 16. Nigam PS, Luke JS. Food additives: Production of microbial pigments and their antioxidant properties. *Curr Opin Food Sci [Internet].* 2016;7:93–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.004>
 17. Bondi M, Lauková A, De Niederhausern S, Messi P, Papadopoulou C. Natural preservatives to improve food quality and safety. *J Food Qual.* 2017;2017.
 18. Vinha AF, Rodrigues F, Nunes MA, Oliveira MBPP. Natural pigments and colorants in foods and beverages. *Polyphenols Prop Recover Appl.* 2018;363–91.
 19. Amchova P, Kotolova H, Ruda-Kucerova J. Health safety issues of synthetic food colorants. *Regul Toxicol Pharmacol [Internet].* 2015;73(3):914–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.026>
 20. Sigurdson GT, Tang P, Giusti MM. Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2017;8(1):261–80.
 21. Chatham LA, Paulsmeyer M, Juvik JA. Prospects for economical natural colorants: insights from maize. *Theor Appl Genet [Internet].* 2019;132(11):2927–46. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03414-0>
 22. Lia A, Ciervo R, Dutra R, Severo J. BIOADITIVOS E ADITIVOS NATURAIS EM ALIMENTOS : CORANTES , ANTIOXIDANTES. :77–93.
 23. Ngamwonglumlert L, Devahastin S, Chiewchan N. Natural colorants: Pigment stability and extraction yield enhancement via utilization of appropriate pretreatment and extraction methods. *Crit Rev Food Sci Nutr [Internet].* 2017;57(15):3243–59. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1109498>
 24. Albuquerque BR, Oliveira MBPP, Barros L, Ferreira ICFR. Could fruits be a reliable source of food colorants? Pros and cons of these natural additives. *Crit Rev Food Sci Nutr [Internet].* 2021;61(5):805–35. Available from:

- <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1746904>
25. Maoka T. Carotenoids as natural functional pigments. *J Nat Med* [Internet]. 2020;74(1):1–16. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>
 26. H. J. Buckenhüskes. *Capsicum*. 1st Editio. CRC Press; 2003. 8 p.
 27. Horbowicz M, Grzesiuk A, DEBski H, Kosson R. Anthocyanins of Fruits and Vegetables - Their Occurrence, Analysis and Role in Human. *Veg Crop Res Bull*. 2008;68:5–22.
 28. De Mejia EG, Zhang Q, Penta K, Eroglu A, Lila MA. The Colors of Health: Chemistry, Bioactivity, and Market Demand for Colorful Foods and Natural Food Sources of Colorants. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2020.
 29. Bendokas V, Skemiene K, Trumbeckaite S, Stanys V, Passamonti S, Borutaite V, et al. Anthocyanins: From plant pigments to health benefits at mitochondrial level. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2020.
 30. Cecilio Filho AB, Souza RJ de, Braz LT, Tavares M. *Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais*. *Ciência Rural*. 2000;
 31. HENRY BS. *Natural Food Colorants*. 2º Ed. HENDRY GAF, HOUGHTON JD, editors. Glasgow: Blackie Academic e Professional; 1996. 40–79 p.
 32. Roriz CL, Barros L, Prieto MA, Barreiro MF, Morales P, Ferreira ICFR. Modern extraction techniques optimized to extract betacyanins from *Gomphrena globosa* L. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2017;105(May):29–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.008>
 33. Sadowska-Bartosz I, Bartosz G. Biological properties and applications of betalains. *Molecules*. 2021;26(9):1–36.
 34. Martins N, Roriz CL, Morales P, Barros L, Ferreira ICFR. Coloring attributes of betalains: A key emphasis on stability and future applications. *Food Funct*. 2017;8(4):1357–72.
 35. Santos-Sánchez NF, Salas-Coronado R, Valadez-Blanco R, Hernández-Carlos B, Guadarrama-Mendoza PC. Natural antioxidant extracts as food preservatives. *Acta Sci Pol Technol Aliment*. 2017;16(4):361–70.
 36. Juneja VK, Dwivedi HP, Yan X. Novel Natural Food Antimicrobials. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2012;3(1):381–403.
 37. Feketea G, Tsabouri S. Common food colorants and allergic reactions in children: Myth or reality? *Food Chem* [Internet]. 2017;230:578–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.043>

38. Cassidy A. Berry anthocyanin intake and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*. 2018.
39. McNamara RK, Kalt W, Shidler MD, McDonald J, Summer SS, Stein AL, et al. Cognitive response to fish oil, blueberry, and combined supplementation in older adults with subjective cognitive impairment. *Neurobiol Aging*. 2018;
40. Płotka-Wasyłka J, Rutkowska M, Owczarek K, Tobiszewski M, Namieśnik J. Extraction with environmentally friendly solvents. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2017.
41. Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*. 2006.
42. Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, et al. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *J Food Drug Anal*. 2014;
43. Naczki M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*. 2004.
44. Rocchetti G, Blasi F, Montesano D, Ghisoni S, Marcotullio MC, Sabatini S, et al. Impact of conventional/non-conventional extraction methods on the untargeted phenolic profile of *Moringa oleifera* leaves. *Food Res Int* [Internet]. 2019;115(August 2018):319–27. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.046>
45. Gori A, Boucherle B, Rey A, Rome M, Fuzzati N, Peuchmaur M. Development of an innovative maceration technique to optimize extraction and phase partition of natural products. *Fitoterapia*. 2021;148(December 2020).
46. Xu DP, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, et al. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *Int J Mol Sci*. 2017;18(1):20–31.
47. Nn A. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants*. 2015;04(03):3–8.
48. Li H Bin, Jiang Y, Wong CC, Cheng KW, Chen F. Evaluation of two methods for the extraction of antioxidants from medicinal plants. *Anal Bioanal Chem*. 2007;388(2):483–8.
49. Sánchez-Camargo AP, Montero L, Mendiola JA, Herrero M, Ibáñez E. Novel Extraction Techniques for Bioactive Compounds from Herbs and Spices. *Herbs, Spices Med Plants*. 2020;95–128.

50. Zhang QW, Lin LG, Ye WC. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Med (United Kingdom)* [Internet]. 2018;13(1):1–26. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>
51. Tomovic V, Sojic B, Jokanovic M, Skaljac S, Pavlic B. Application of essential oil and supercritical fluid extracts in meat processing. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci.* 2019;333(1).
52. Bimakr M, Rahman RA, Taip FS, Ganjloo A, Salleh LM, Selamat J, et al. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food Bioprod Process.* 2011;
53. Delazar A, Nahar L, Hamedeyazdan S, Sarker SD. Microwave-assisted extraction in natural products isolation. *Methods Mol Biol.* 2012;864:89–115.
54. Bernal J, Mendiola JA, Ibáñez E, Cifuentes A. Advanced analysis of nutraceuticals. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;55(4):758–74.
55. Aronson JK. Defining ‘nutraceuticals’: neither nutritious nor pharmaceutical. *Br J Clin Pharmacol.* 2017;83(1):8–19.
56. Lu PS, Inbaraj BS, Chen BH. Determination of oral bioavailability of curcuminoid dispersions and nanoemulsions prepared from *Curcuma longa* Linnaeus. *J Sci Food Agric.* 2018;98(1):51–63.
57. Roriz CL, Xavier V, Heleno SA, Pinela J, Dias MI, Calhella RC, et al. Chemical and bioactive features of *amaranthus caudatus* l. Flowers and optimized ultrasound-assisted extraction of betalains. *Foods.* 2021;10(4).
58. Iyda JH, Fernandes Â, Ferreira FD, Alves MJ, Pires TCSP, Barros L, et al. Chemical composition and bioactive properties of the wild edible plant *Raphanus raphanistrum* L. *Food Res Int.* 2019;121.
59. AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International. Assoc Off Anal Chem Int. 2016;
60. Stefanov I, Vlaeminck B, Fievez V. A novel procedure for routine milk fat extraction based on dichloromethane. *J Food Compos Anal* [Internet]. 2010;23(8):852–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.016>
61. Tonial IB, Matsushita M, De Souza NE, De Lima Perini JÂ, De Moraes DR, Bani FA, et al. Avaliação de diferentes métodos de extração lipídica sobre a composição de ácidos graxos poliinsaturados em leite de vaca. *Arch Latinoam Nutr.* 2009;59(1):78–81.

62. Barbano DM, Clark JL, Dunham CE, Flemin RJ. Kjeldahl Method for Determination of Total Nitrogen Content of Milk: Collaborative Study. *J Assoc Off Anal Chem* [Internet]. 1990 Nov 1;73(6):849–59. Available from: <https://doi.org/10.1093/jaoac/73.6.849>
63. Galvani F, Gaertner E. Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta. Embrapa Pantanal-Circular Técnica (INFOTECA-E). 2006;
64. Mapari SAS, Meyer AS, Thrane U. Colorimetric characterization for comparative analysis of fungal pigments and natural food colorants. *J Agric Food Chem*. 2006;54(19):7027–35.
65. Labuza TP. The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration. *Food Technol*. 1980;34(JANUARY 1980).
66. Mathlouthi M. Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs. *Food Control*. 2001;12(7):409–17.
67. L.B. R, F SG. *Water Activity: Influences on Food Quality*. Academic Press; 1981.

8. ANEXOS

Formulário de avaliação sensorial

O meu nome é Sandra Marcelino, estudante do Mestrado em Farmácia e Química de Produtos Naturais.

Venho solicitar a sua colaboração nesta prova sensorial de um conjunto de alimentos por forma a recolher dados para o projeto de investigação 'Corantes e conservantes naturais e inclusão numa dieta saudável'. As suas respostas serão confidenciais, garantindo-se o total anonimato.

Agradeço a sua participação

1. Qual o seu tipo de alimentação?

Marcar apenas uma oval.

- Dieta Normal
 Vegan
 Vegetariana

2. É alérgico a algum alimento?

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não

3. Se sim, a qual?

4. Sexo

Marcar apenas uma oval.

- Feminino
 Masculino

5. Idade

6. É consumidor de doçaria?

Marcar apenas uma oval.

Sim

Não

7. Se sim, qual a frequência?

Marcar apenas uma oval.

Raramente

1 vez por mês

2 vezes por mês

3 vezes por mês

1 vez por semana

2 vezes por semana

3 vezes por semana

Diariamente

8. Sabe o que são aditivos naturais?

Marcar apenas uma oval.

Não

Sim

9. Se sim, diga algum ou a sua função.

10. Se sim, o que é?

**Parâmetros
de prova
sensorial**

Serão dados 9 alimentos a provar, nomeadamente cheesecakes, manteigas e gelados de três cores diferentes (rosa, vermelho e laranja). Solicita-se que nos forneça a sua apreciação de acordo com a sua cor. Serão avaliados diferentes parâmetros (sabor, características olfativas e aspeto geral).

Cheesecake



11. Características do sabor

Marcar apenas uma oval por linha.

	Rosa Claro	Rosa Escuro	Cor de Laranja	Amarelo
Qual é o mais doce?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Qual é o que tem um sabor mais persistente?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Qual é o mais amargo?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

12. Características olfativas

Marcar apenas uma oval por linha.

	Rosa Claro	Rosa Escuro	Cor de Laranja	Amarelo
Qual é o que tem um odor mais intenso?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Qual é que tem um odor mais desagradável?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

13. Aspeto Geral

Marcar apenas uma oval por linha.

	Rosa Claro	Rosa Escuro	Cor de Laranja	Amarelo
Qual é o que tem melhor aparência?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

16. Aspeto Geral

Marcar apenas uma oval por linha.

	Rosa Claro	Rosa Escuro	Cor de Laranja	Amarelo
Qual é a que tem melhor aparência?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Gelado



Vamos dar-lhe a provar os gelados.

17. Características do sabor

Marcar apenas uma oval por linha.

	Rosa Claro	Rosa Escuro	Cor de Laranja	Amarelo
Qual é a mais doce?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Qual é a que tem um sabor mais persistente?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Qual é a mais amarga?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

18. Características olfativas

Marcar apenas uma oval por linha.

	Rosa Claro	Rosa Escuro	Cor de Laranja	Amarelo
Qual é a que tem um odor mais intenso?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Qual é a que tem um odor mais agradável?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

19. Aspeto Geral

Marcar apenas uma oval por linha.

	Rosa Claro	Rosa Escuro	Cor de Laranja	Amarelo
Qual é a que tem melhor aparência?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

20. Compraria algum destes produtos que provou?

Marcar apenas uma oval.

Sim

Não

21. Se sim, qual ou quais compraria?
