



Desenvolvimento de um alimento funcional com subprodutos de sabugueiro: caracterização química e bioativa

Andreia Catarina Ribeiro Sousa

*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*

Orientadores:

Sandrina Alves Heleno

João Carlos Martins Barreira

Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira

Esta dissertação inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri

Bragança

Outubro 2017

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



Agradecimentos

Aos meus pais por todo o esforço e sacrifício que têm feito para poder seguir os meus sonhos. Por acreditarem e incentivarem a concluir os meus objetivos e as minhas metas, por me proporcionarem todas as ferramentas para ser aquilo que sou hoje. Agradeço-vos infinitamente.

Ao meu namorado Ricardo Silva por ter sido o meu suporte neste caminho, por todo o auxílio, gentileza e companheirismo; e por toda a tolerância que sempre demonstrou.

Aos meus orientadores Doutora Sandrina Heleno e Doutor João Barreira pela excelente orientação, por terem partilhado comigo a sua experiência e os seus conhecimentos, pela disponibilidade e simpatia, obrigada por me acompanharem neste trilha.

À professora Doutora Isabel Ferreira por me proporcionar e dar a conhecer o mundo da investigação e por me dar a oportunidade de crescer enquanto aluna. É um exemplo a seguir.

À Doutora Lillian Barros por todo o apoio, disponibilidade e simpatia que sempre disponibilizou.

A todas as pessoas do Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada (LQBA) - BioChemCore pela simpatia e disponibilidade. Um especial agradecimento ao Custódio Roriz e Ângela Fernandes pela assistência, dedicação e prontidão que sempre demonstraram.

A todos os meus amigos e familiares que direta ou indiretamente contribuíram na conclusão deste projeto.

Obrigada!

Resumo

A planta *Sambucus nigra* L., comumente designada como sabugueiro, é um arbusto da família *Adoxaceae*, que cresce espontaneamente em vários locais da Europa, Ásia, Norte da África e EUA, sendo os seus frutos particularmente conhecidos pela riqueza em compostos fenólicos (em especial, ácidos fenólicos, flavonoides e antocianinas), entre outros metabolitos secundários como glicosídeos de iridóides, sesquiterpenos, triterpenos, e fitosteróis. A presença destas moléculas, confere à planta inúmeras propriedades bioativas como antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, entre outras. As antocianinas, componentes mais abundantes no fruto do sabugueiro constituem o maior grupo de pigmentos solúveis em água, podendo ser incorporadas em diversas matrizes alimentares como corantes naturais, tirando também partido dos seus efeitos benéficos para a saúde humana. O sumo de bagas de sabugueiro é tradicionalmente utilizado na preparação de licores e compotas. Após a extração do sumo, o bagaço remanescente, maioritariamente constituídos pela película das bagas, poderá também conter importantes quantidades de compostos bioativos e com capacidade corante. Desta forma, a utilização do bagaço de sabugueiro pode revelar-se interessante para o desenvolvimento de corantes naturais, uma vez que há um interesse crescente na sua utilização por parte de diferentes indústrias, principalmente a alimentar (devido à crescente restrição do uso de corantes sintéticos).

Assim, este trabalho focou-se na caracterização da bioatividade e perfil antociânico de extratos de bagaço de sabugueiro. Estes extratos foram posteriormente incorporados numa nova formulação de um produto de pastelaria bem conhecido, para avaliar a sua utilização como corante natural com propriedades bioativas. Para efeitos de comparação da eficácia corante, foram preparadas formulações adicionais incorporando corantes comerciais, bem como outras sem qualquer corante incorporado. Os produtos preparados foram caracterizados quanto às suas propriedades físico-químicas e bioativas, tendo sido verificado que o extrato de bagaço de sabugueiro apresenta elevado potencial como corante natural neste tipo de produtos, apresentando um desempenho similar ao do corante comercial.

Palavras-chave: *Sambucus nigra* L., antocianinas, bioatividade, corantes naturais, alimentos funcionais.

Abstract

The plant *Sambucus nigra* L., commonly known as elderberry, is a shrub of the Caprifoliaceae family, which grows spontaneously in Europe, Asia, North Africa and USA. Its fruits are particularly known for the richness in phenolic compounds (in particular, phenolic acids, flavonoids and anthocyanins), among other secondary metabolites such as iridoid glycosides, sesquiterpenes, triterpenes, and phytosterols, which provide different bioactive properties, such as antioxidant, antimicrobial, antitumor, among others.

Anthocyanins, the most abundant components in elderberry fruit, are the largest group of water-soluble pigments, allowing their incorporation as natural dyes into several food matrices, taking also advantage of their beneficial effects on human health. Elderberry juice is traditionally used in the preparation of liqueurs and jams. After juice extraction, the remaining pomace, mainly composed of berries' skins, may also contain important amounts of bioactive compounds with colouring ability. Thus, using elderberry may be of interest to obtain natural dyes, since there is a growing interest in its use by different industries, especially food industry (due to the increasing restriction of the use of synthetic dyes).

Thus, this work focused on the characterization of the bioactivity and anthocyanin profile of elderberry extracts. These extracts were then incorporated into a new formulation of a well-known pastry product to evaluate its use as a natural dye with bioactive properties. To compare the colouring capacity, additional formulations incorporating commercial dyes, as well as others without any incorporated dye, were also prepared. All samples were characterized regarding physicochemical and bioactive properties, having been verified that the extract of elderberry has high potential as a natural dye in this type of products, presenting a performance similar to commercial dye.

Keywords: *Sambucus nigra* L., anthocyanins, bioactivity, natural dyes, functional foods.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice de tabelas	vii
Lista de abreviaturas	viii
I. Introdução	1
1.1. Enquadramento	1
1.2. Stress oxidativo, espécies reativas de oxigénio e antioxidantes	2
1.3. Caracterização química e botânica do sabugueiro	4
1.4. Compostos fenólicos	8
1.5. Antocianinas	11
1.5.1. Aplicações de antocianinas na indústria	15
1.5.2. Antocianinas - um corante natural	15
1.6. Corantes	17
1.6.1. Corantes naturais vs corantes sintéticos	19
1.7. Bio-resíduos	20
1.8. Alimentos funcionais	20
1.9. Incorporação de antocianinas em produtos de confeitaria	22
1.10. Objetivos	24
II. Material e Métodos	25
2.1. Padrões e reagentes	25
2.2. Recolha e preparação de amostras	26
2.3. Procedimentos de extração das amostras	26
2.3.1. Maceração	26

2.3.2.	Ultrassons	26
2.4.	Ensaio de avaliação da atividade antioxidante	27
2.4.1.	Poder Redutor	27
2.4.2.	Atividade captadora de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)	28
2.4.3.	Inibição da descoloração do β -caroteno	28
2.5.	Ensaio da atividade inibitória do crescimento de linhas celulares tumorais humanas	29
2.6.	Análise cromatográfica de antocianinas	31
2.7.	Incorporação do extrato no alimento	33
2.7.1.	Preparação da massa choux	33
2.7.2.	Preparação do merengue italiano (recheio)	33
2.8.	Caracterização química dos profiteroles	34
2.8.1.	Teor de humidade	34
2.8.2.	Teor de cinzas	34
2.8.6.	Determinação da cor	37
2.9.	Análise estatística	39
III.	Resultados e Discussão	40
3.1.	Caracterização bioativa dos extratos de “bagaço” de sabugueiro	40
3.2.	Caracterização das novas formulações de profiterole	42
3.2.1.	Composição nutricional	43
3.1.1.	Ácidos gordos	44
3.1.2.	Parâmetros de cor	46
3.1.3.	Bioatividade das formulações de profiterole	48
3.1.4.	Estabilidade dos agentes corantes	49
IV.	Conclusão	50

Índice de figuras

Figura 1- Visão geral das reações que levam à formação de ROS. As setas verdes representam a peroxidação lipídica, as setas azuis representam as reações de Haber-Weiss e as setas vermelhas representam as reações de Fenton. SOD refere-se à enzima superóxido e CAT à enzima catalase. (Carocho, et al., 2012).....	4
Figura 2- Inflorescência de sabugueiro.....	5
Figura 3- Bagas de sabugueiro.....	6
Figura 4- Estrutura química da sambunigrina.....	7
Figura 5- Estrutura geral das antocianinas.....	11
Figura 6- Biossíntese de antocianinas.....	11
Figura 7- Estrutura da cianidina-3-O-glucósido.....	12
Figura 8- Leitor de microplacas para leitura das absorvâncias.....	27
Figura 9- Equipamentos utilizados na identificação de antocianinas. HPLC-MS.....	32
Figura 10- Mufla utilizada para a incineração das amostras.....	35
Figura 11- Equipamento Soxhlet utilizado para extração de gorduras.....	36
Figura 12- Equipamentos utilizados para determinação de teor de proteínas. A-Digestor, B-Equipamento Kjehdal.....	37
Figura 13- Equipamento usado para a identificação de açúcares. HPLC-RI.....	39
Figura 14- Diferentes formulações de profiteroles. A-receita base (PB), B-receita aditivada com extrato de "bagaço" de sabugueiro (PBS), receita aditivado com corante comercial (PCC).	42
Figura 15- Diferentes formulações de profiteroles com recheio. A-receita base (PB), B-receita aditivada com extrato de "bagaço" de sabugueiro (PBS), receita aditivado com corante comercial (PCC).....	43

Índice de tabelas

Tabela 1- Estrutura básica de alguns compostos fenólicos.	9
Tabela 2- Principais classes de flavonoides.	10
Tabela 3- Estrutura básica das principais antocianidinas	13
Tabela 4- Antocianinas (mg/g de extrato) quantificadas no “bagaço” do sumo de sabugueiro.	41
Tabela 5- Atividade antioxidante dos diferentes extratos de “bagaço” do sumo de sabugueiro. Os resultados são apresentados como valores de EC ₅₀ , em mg/mL.....	42
Tabela 6- Composição nutricional, açúcares livres (g/100 g) e valor energético (kcal/100 g) das diferentes formulações de profiteroles.	44
Tabela 7- Composição em ácidos gordos (%) dos profiteroles (média ± desvio-padrão).	45
Tabela 8- Parâmetros de cor (L*, a* e b*) medidos no exterior e no recheio das diferentes formulações de profiteroles.....	47
Tabela 9- Atividade antioxidante das diferentes formulações de profiteroles. Os resultados são apresentados como valores de EC ₅₀ , em mg/mL.	49

Lista de abreviaturas

ACR: atividade captadora de radicais

AGS: Ácidos gordos saturados

AGMI: Ácidos gordos insaturados

AGPI: Ácidos gordos polinsaturados

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium

DMSO: dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazilo

EC₅₀: Concentração de extrato a que corresponde 50 % de inibição

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EFSA: European Food Safety Authority

EUA: Estados Unidos da América

FAME: esteres metílicos de ácidos gordos

FBS: soro fetal bovino

FDA: Food and Drug Administration

GC/FID: cromatografia gasosa acoplada de detetor de ionização de chama

GI₅₀: Concentração de extrato responsável por 50% de inibição de crescimento celular

HeLa: Linha celular humana de carcinoma cervical

HePG2: Linha celular humana de carcinoma hepatocelular

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPLC-RI: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração

MCF7: Linha celular humana de adenocarcinoma de mama

MS: espetrometria de massa

NCI-H460: Linha celular humana de cancro de pulmão

NCI: National Cancer Institute

PAL: Fenilalanina amónia liase

RNS: Espécies reativas de azoto

ROS: Espécies reativas de oxigénio

rpm: Rotações por minuto

RSS: Espécies reativas de enxofre

SRB: Sulforrodamina B

TCA: ácido tricloroacético

UV: ultravioleta

I. Introdução

1.1. Enquadramento

A população começa a procurar ter uma alimentação saudável e a compreender melhor a relação entre um estilo de vida saudável e os hábitos alimentares adequados.

Qualquer alimento fornece energia e nutrientes essenciais à vida, no entanto alguns alimentos acrescentam efeitos benéficos à saúde, os alimentos funcionais. Certos compostos fenólicos presentes nos alimentos podem ajudar a limitar alguns danos oxidativos atuando diretamente sobre espécies reativas de oxigénio ou estimulando os sistemas de defesa endógenos.

O interesse pelas antocianinas, em virtude dos seus efeitos terapêuticos, tem permitido definir novas perspetivas na obtenção de produtos altamente valiosos. O facto de poderem ser incluídas em diversos alimentos concede aos mesmos características mais saudáveis, naturais e funcionais, tornando-os mais apelativos ao consumidor. Para além das suas propriedades bioativas, as antocianinas têm um poder corante imenso, o que em muito pode contribuir para o desenvolvimento de produtos alimentares mais apelativos para o consumidor, e, portanto, mais competitivos do ponto de vista económico.

A produção de corantes naturais tem demonstrado o quanto é interessante investigar questões relacionadas com viabilidade da sua produção, em substituição aos corantes sintéticos, e, ao mesmo tempo, tem permitido o desenvolvimento de técnicas de pigmentação, que podem tornar estes corantes mais estáveis, facilitando e ampliando as suas aplicações.

Neste sentido, e como consequência do crescente interesse nesta temática, este trabalho surge com o objetivo de desenvolver um alimento funcional e inovador com subprodutos de sabugueiro e conhecer as suas características fitoquímicas e propriedades antioxidantes.

1.2. Stress oxidativo, espécies reativas de oxigénio e antioxidantes

Entende-se por radicais livres qualquer espécie química, átomo, molécula ou ião, que contenha um ou mais eletrões desemparelhados na orbital de valência. Deste modo, os compostos são altamente instáveis e apresentam uma forte reatividade com a maioria das espécies químicas. Estes derivam de três elementos: azoto, oxigénio e enxofre, criando assim as espécies reativas de oxigénio (ROS), azoto (RNS) e enxofre (RSS) (Ferreira, et al., 2007) (Carocho, et al., 2012). No metabolismo celular normal, no decorrer do processo de conversão energética mitocondrial, há formação de ROS que são prioritariamente eliminadas pelo sistema de defesa antioxidante da célula, mantendo-se assim um equilíbrio entre o estado oxidativo e os mecanismos protetores antioxidantes, fundamental para o funcionamento normal do organismo (Teixeira, et al., 2014).

Em concentrações moderadas, os ROS podem ser benéficos, estando envolvidos em vários processos fisiológicos de sinalização e de regulação. Porém quando existe um desequilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes, devido a uma produção excessiva de ROS, ou por uma deficiência nas defesas antioxidantes da célula, nestas situações os ROS em excesso podem oxidar e danificar lípidos celulares, proteínas e DNA, levando à sua modificação e à sua inutilização, inibindo a sua função normal, correspondendo este desequilíbrio ao chamado stress oxidativo (Gammella, et al., 2016) (Ferreira, et al., 2007) (Poprac, et al., 2017).

As espécies reativas do oxigénio (ROS) estão implicadas numa série de processos degenerativos, graças às suas propriedades de serem ou de originarem radicais livres.

Pela sua configuração eletrónica, o oxigénio tende a receber um eletrão de cada vez formando assim compostos altamente reativos como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo (HO^{\cdot}) (Ferreira, et al., 2007) (Pisoschi, et al., 2015).

O *stress* oxidativo pode ocorrer através de simples causas naturais mas também por intermédio de causas não naturais como a presença de xenobióticos no organismo.

A produção não controlada de radicais livres está associada a diversas doenças como: cancro, doenças cardiovasculares, diabetes, desordens do foro neurológico como Alzheimer e também com o processo de envelhecimento (Pisoschi, et al., 2015) (Rani, et al., 2016) (Wojtunik-Kulesza, et al., 2016).

Para evitar os danos causados pelos ROS, provenientes de diversas fontes, o organismo desenvolveu diversos mecanismos de defesa, ou seja, desenvolveu potenciais de neutralização de ações dos radicais livres, genericamente designados como antioxidantes.

Os antioxidantes podem interagir com radicais livres através de mecanismos de:

- **captação**, quando o antioxidante age formando um radical livre em outro menos reativo;
- **quelatação de iões metálicos**, para que não consigam gerar espécies reativas ou decompor peróxidos;
- **quenching**, quando previnem a formação de peróxidos;
- **interrupção** da cadeia auto-oxidativa;
- **redução** das concentrações de O_2 . (Oroian, et al., 2015)

Os antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos ou não enzimáticos de acordo com a estrutura do agente antioxidantes (Carocho, et al., 2012) (Pisoschi, et al., 2015).

Os antioxidantes enzimáticos encontram-se espalhadas por todo o organismo, tanto no meio intracelular como no meio extracelular e agem evitando a acumulação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e do peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Alguns exemplos destas defesas enzimáticas são o superóxido dismutase, a catalase, a glutathione peroxidase e glutathione reductase (**figura 1**). Em relação aos antioxidantes não enzimáticos destacam-se compostos como a glutathione, o α -tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), o ácido lipóico, os carotenóides, os flavonóides entre outros (Ferreira, et al., 2007) (Carocho, et al., 2012) (Pisoschi, et al., 2015).

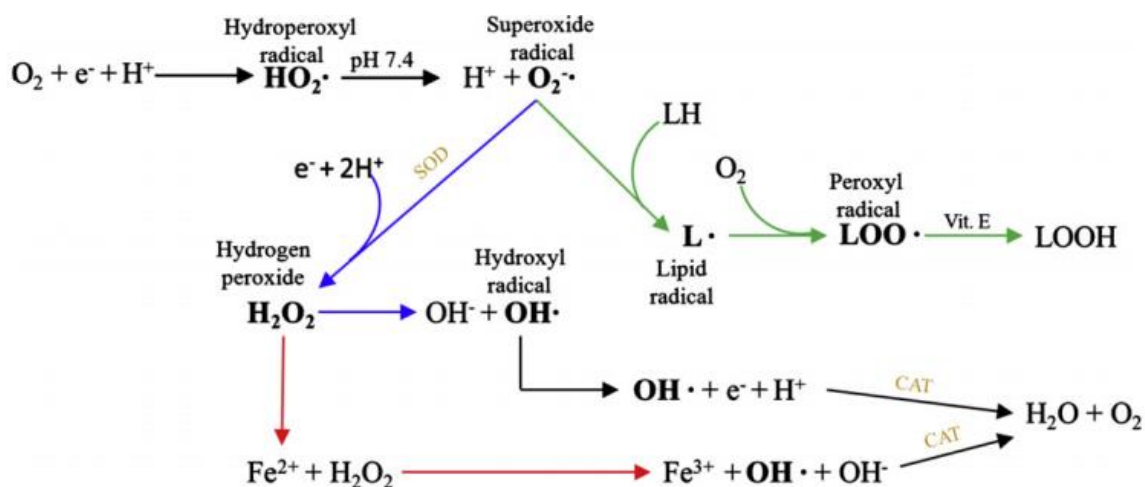


Figura 1- Visão geral das reações que levam à formação de ROS. As setas verdes representam a peroxidação lipídica, as setas azuis representam as reações de Haber-Weiss e as setas vermelhas representam as reações de Fenton. SOD refere-se à enzima superóxido e CAT à enzima catalase. (Carocho, et al., 2012)

Além destas defesas endógenas, existem moléculas naturais e sintéticas com propriedades antioxidantes que podem assumir um papel importante num sistema exógeno de defesa, como os fitoquímicos. Os antioxidantes encontrados nos alimentos assumem uma grande importância como possíveis agentes protetores, uma vez que podem interagir com radicais livres e reduzir os danos oxidativos (Ferreira, et al., 2007) (Pisoschi, et al., 2015).

1.3. Caracterização química e botânica do sabugueiro

Existem diversas espécies de sabugueiro, como o sabugueiro vermelho (*Sambucus racemosa*), que possui bagas vermelhas brilhantes que amadurecem em julho; o sabugueiro de bagas vermelhas, com casca escura (*Sambucus pubens*), ou o sabugueiro anão (*Sambucus ebulus*), que apresenta frutos vermelhos acastanhados não comestíveis.

Em Portugal pode ser encontrado o sabugueiro negro (*Sambucus nigra* L.), caracterizado pelas suas folhas verdes escuras, flores agrupadas (**figura 2**) que exalam um aroma agradável, e bagas de cor púrpura agrupadas em infrutescências (**figura 3**) (Santos, 2016).



Figura 2-Inflorescência de sabugueiro.

O sabugueiro-negro, vulgarmente conhecido apenas como sabugueiro, é uma espécie bem disseminada, que cresce espontaneamente em bosques e terrenos não cultivados com exposição solar na maior parte da Europa, Ásia, Norte da África e EUA. É um arbusto pertencente à família *Adoxaceae* (Viapiana, et al., 2017) de folha caduca, podendo alcançar até 6 m de altura. No início do verão apresenta pequenas flores brancas hermafroditas em grandes corimbos. As drupas consistem em bagas individuais inicialmente verdes, apresentando coloração avermelhada após o processo de maturação e coloração negra a negra-azulada, quando completamente maduras, atingindo um diâmetro máximo de 6 mm (**Figura 3**) (Veberic, et al., 2009) .



Figura 3-Bagas de sabugueiro.

Os extratos de *S. nigra* possuem uma enorme quantidade de fitoquímicos, conferindo à planta inúmeras propriedades bioativas tais como: antioxidante, antibacteriana, antitumoral, antiviral, anti-inflamatória e ainda imunestimulante (Duymus, et al., 2014).

De forma geral, um antioxidante pode ser definido como uma substância que, mesmo em baixas concentrações, retarda ou previne a oxidação. Assim, alimentos ricos em antioxidantes têm demonstrado um papel essencial na prevenção de doenças como cancro, doenças neurodegenerativas e doenças cardiovasculares (Oliveira, et al., 2011).

As propriedades antioxidantes de *S. nigra* estão relacionadas com a presença de flavonoides (flavonas, flavanonas, antocianinas e derivados de isoflavonas) que atuam ao nível da proteção contra espécies reativas de oxigénio (ROS) tais como superóxido, hidroxilo e peróxido (Sharma, et al., 2012). As partes botânicas de sabugueiro não apresentam apenas propriedades benéficas. As folhas, as sementes, a casca e as bagas verdes acumulam compostos potencialmente tóxicos, com destaque para a sambunigrina (glicosídeo cianogénico) (**Figura 4**) (Ulbricht, et al., 2014) (Senica, et al., 2016).

A ingestão deste componente em doses elevadas pode causar distúrbios gastrointestinais como náuseas, vômitos, ou ainda fraqueza, tonturas e taquicardia (Ulbricht, et al., 2014). Assim sendo, é recomendada a ingestão das bagas processadas termicamente ou fermentadas, durante as quais estes compostos são neutralizados (Wilson, et al., 2016).

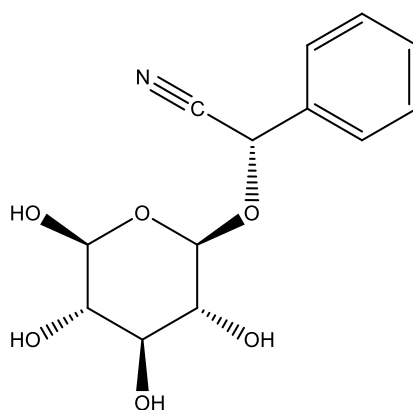


Figura 4- Estrutura química da sambunigrina.

Não são conhecidas interações entre o sabugueiro, componentes de alimentos e outras plantas medicinais. No entanto, é importante referir que as plantas medicinais contêm muitos componentes que podem interagir com medicamentos convencionais. Não existem estudos sobre a interação de *S. nigra* com medicamentos porém é recomendada especial atenção na utilização de sabugueiro com medicamentos antidiabéticos, diuréticos, morfina, fenobarbital e drogas imunológicas (Sidor, et al., 2015). Devido à falta de informação sobre a sua toxicidade não é recomendada a ingestão de sabugueiro em mulheres gestantes ou que se encontrem em período de amamentação (EMA, 2013).

Tal como já referido, a espécie *S. nigra* é rica em compostos fenólicos, incluindo ácidos fenólicos, flavonoides, catequinas, antocianinas e proantocianidinas (Kinoshita, et al., 2012), para além de outros metabolitos secundários como glicosídeos de iridóides, sesquiterpenos, triterpenos, e fitoesteróis (Thole, et al., 2005) (Salvador, et al., 2015).

1.4. Compostos fenólicos

As plantas sintetizam uma grande variedade de metabolitos secundários, nos quais se inclui uma grande diversidade de compostos fenólicos. Do ponto de vista químico consideram-se compostos fenólicos todas as estruturas que possuem pelo menos um núcleo benzénico com um ou mais hidroxilos livres ou envolvidos em ligações éster, éter ou heterósido. Porém, esta definição possui algumas exceções como os alcalóides e terpenos que apresentam anéis aromáticos e um átomo de azoto. Desta forma, consideram-se compostos fenólicos todos aqueles que não sendo azotados têm um anel (ou mais) aromático e são principalmente derivados do metabolismo do chiquimato e/ou do acetato (Cunha, 2014).

Entre os principais grupos fenólicos destacam-se os flavonoides, pois apresentam grande variedade de efeitos farmacológicos. São moléculas de baixo peso molecular que se encontram amplamente distribuídas no reino vegetal (Cunha, 2014), sendo considerados os antioxidantes mais abundantes na dieta, quer pela sua capacidade de doar hidrogénio ou eletrões, quer pela existência de radicais intermediários estáveis que têm a finalidade de impedir a oxidação de diversos componentes presentes nos alimentos, particularmente de lípidos (Sucupira, et al., 2012) (Sangeetha, et al., 2016).

Os flavonoides são constituídos por um grande número de famílias de compostos como os flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides (**Tabela 2**) (Santos, et al., 2014). A maioria dos flavonoides presentes nas plantas encontra-se na forma conjugada, principalmente ligados a um ou mais açúcares através de um ou mais grupos fenólicos (Cunha, 2014).

Todos os flavonoides têm por base a estrutura da flavona (2-fenil-benzopirona) podendo ser encontrados em diferentes formas: na forma de aglicona, de glicosídeos ou como derivados metilados (Cunha, 2014). A sua estrutura é derivada de uma benzopirona e a sua base C6-C3-C6 é caracterizada por dois anéis fenilo (A e B), ligados através de um anel pirano (C) (**Tabela 2**) (Vieira, 2015).

Tabela 1- Estrutura básica de alguns compostos fenólicos.

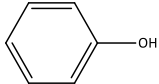
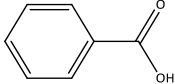
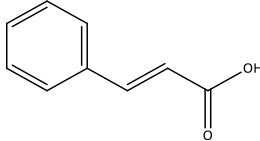
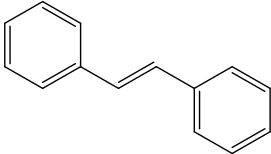
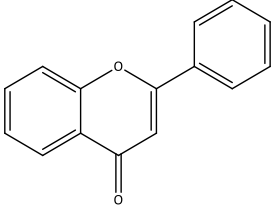
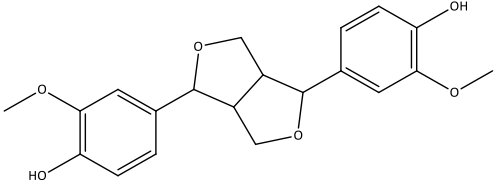
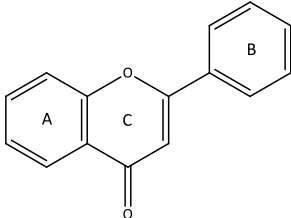
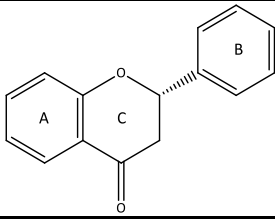
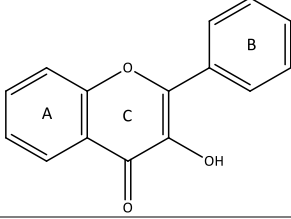
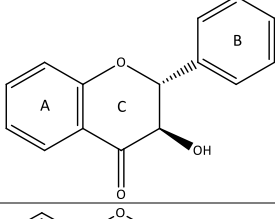
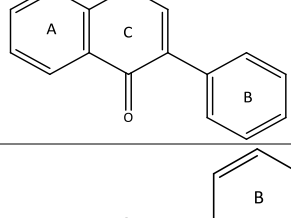
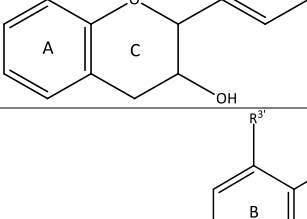
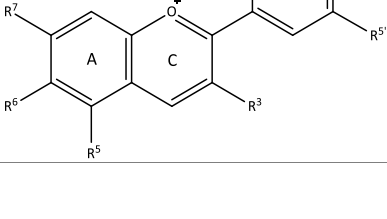
Classe	Esqueleto básico	Estrutura básica
Fenóis simples	C_6	
Ácidos fenólicos	C_6-C_1	
Ácidos hidroxicinâmicos	C_6-C_3	
Estilbenos	$C_6-C_2-C_6$	
Flavonoides	$C_6-C_3-C_6$	
Lignanós	$(C_6-C_3)_2$	

Tabela 2- Principais classes de flavonoides.

Flavonoide	Estrutura básica	Exemplos
Flavonas		Apigenina, baicaleína, diosmina, luteolina, tangeritina.
Flavanonas		Hesperidina, naringenina, pinocembrina.
Flavonóis		Azaleatina, galangina, quercetina.
Flavanonóis		Astilbina, taxifolina.
Isoflavonas		Daidzaína, genisteína, prunetina.
Flavanóis ou catequinas		Epicatequina, proantocianidinas, teaflavinas.
Antocianidinas		Cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina, petunidina.

1.5. Antocianinas

As antocianinas são flavonoides, mais concretamente, glucósidos derivados de sais flavílicos polihidroxilados e polimetoxilados (**Figura 5**).

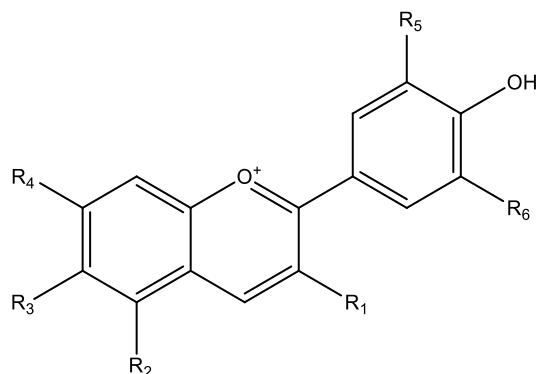


Figura 5-Estrutura geral das antocianinas.

A biossíntese das antocianinas é um dos últimos estados de oxidação no mecanismo de diferenciação dos flavonoides, formando-se a partir de chalconas

(**Figura 6**).

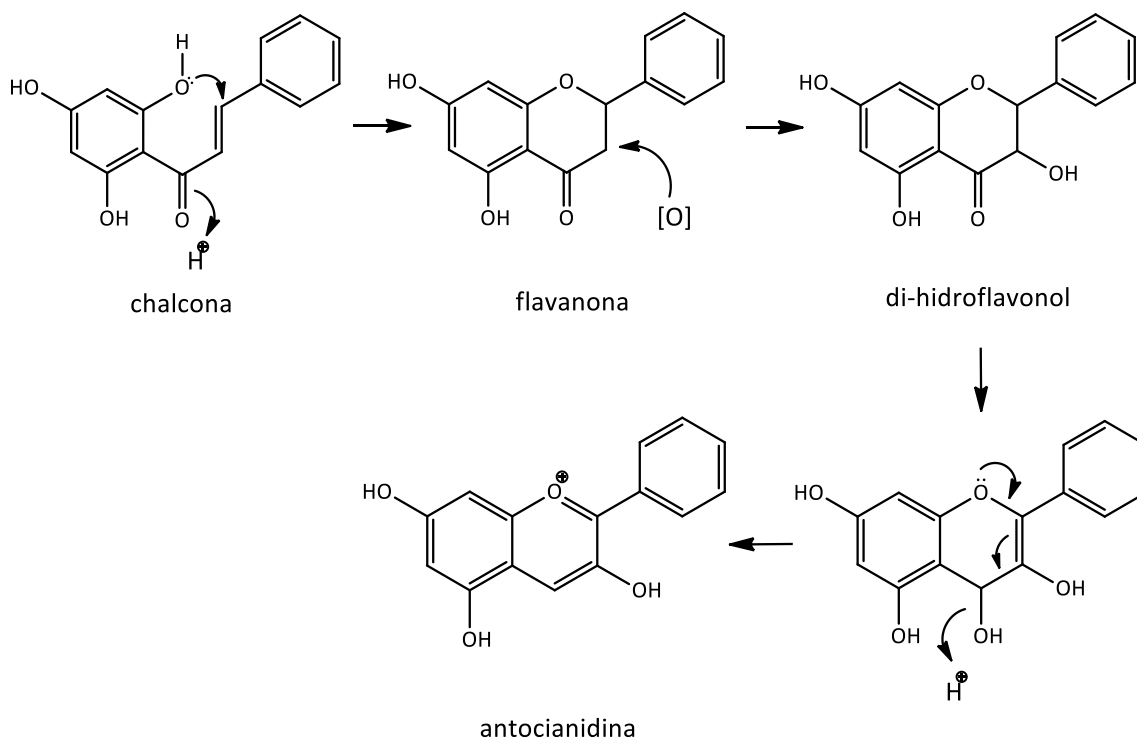


Figura 6-Biossíntese de antocianinas.

Desde a estrutura base até à formação de compostos antociânicos ocorrem muitas reações de modificação e ligação de radicais através de enzimas como flavona-3-hidroxilase, dihidroflavonol-4-redutase, ou 3-*O*-glucosiltransferase. Dependendo dos radicais que se ligam à molécula, da posição e do número de aminoácidos aromáticos ou alifáticos obtêm-se antocianinas distintas (Cunha, 2014).

Até à data, mais de 600 estruturas antociânicas foram encontradas, das quais a cianidina-3-*O*-glucósido é a mais abundante em todo o reino vegetal (**Figura 7**) (Dias, 2011).

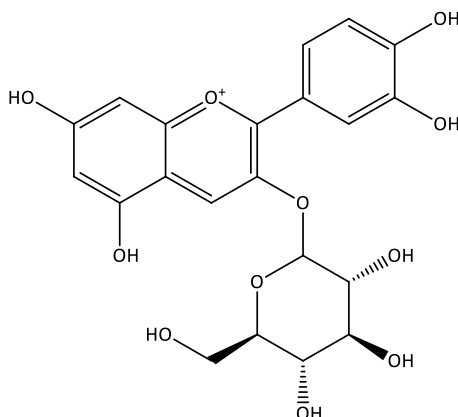


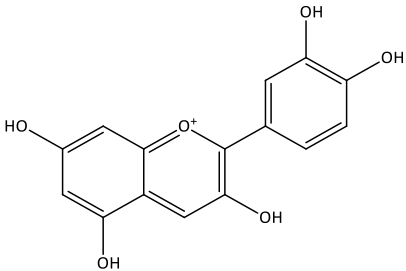
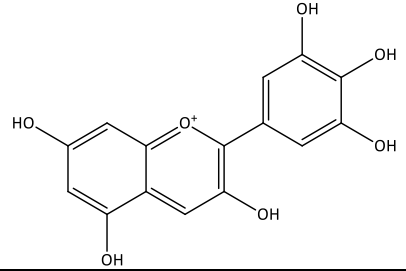
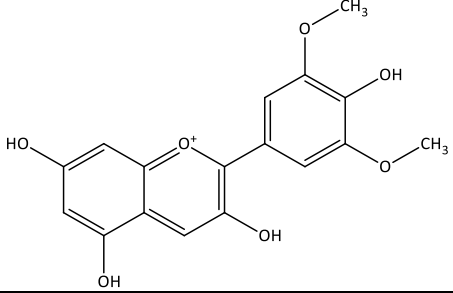
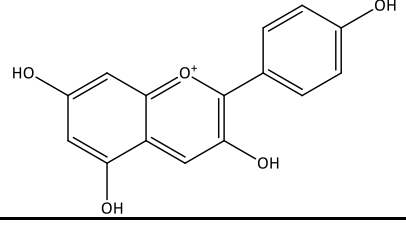
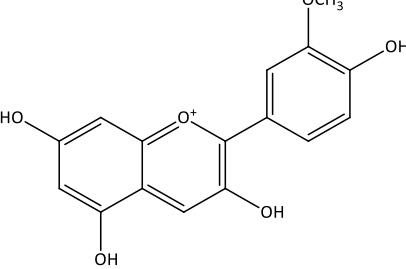
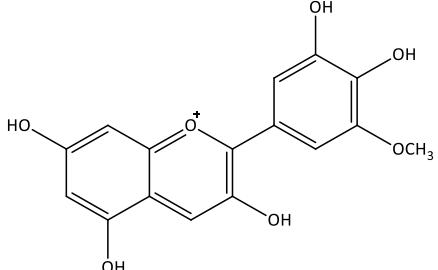
Figura 7- Estrutura da cianidina-3-*O*-glucósido.

Na natureza, encontram-se associadas a moléculas de açúcares, sendo a forma livre (aglicona) denominada como antocianidinas. Para além da ligação a açúcares, as antocianinas estão muitas vezes também associadas a ácidos orgânicos (Novello, 2011).

As principais antocianidinas encontradas nas plantas são a cianidina, a delphinidina, a peonidina (Silva, et al., 2015), a pelargonidina, a petunidina e a malvidina (**Tabela 3**) (Março, et al., 2008) (Ge, et al., 2013).

No sabugueiro, as antocianinas mais abundantes são derivadas das cianidinas, como é o caso da cianidina-3-*O*-glucósido (**Figura 7**), cianidina-3-*O*-sambubiósido, e cianidina-5-*O*-glucósido. No entanto, é possível encontrar também a pelargonidina-3-*O*-glucósido e a delphinidina-3-*O*-rutinósido (Sidor, et al., 2015).

Tabela 3- Estrutura básica das principais antocianidinas

Antocianidina	Fórmula	Estrutura básica	Cor	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Cianidina	$C_{15}H_{11}O_6^+$		Magenta	535
Delfinidina	$C_{15}H_{11}O_7$		Roxo	546
Malvidina	$C_{17}H_{15}O_7^+$		Roxo	542
Pelargonidina	$C_{15}H_{11}O_5^+$		Vermelho	520
Peonidina	$C_{16}H_{13}O_6^+$		Magenta	532
Petunidina	$C_{15}H_{11}O_6^+$		Roxo	543

Naturalmente, a coloração das antocianinas é diretamente influenciada pela substituição dos grupos hidroxilo e metoxilo na molécula. O aumento do número de grupos hidroxilo tende a tornar a coloração azulada; porém, o aumento do número de grupos metoxilo aumenta a intensidade da coloração vermelha. Esta coloração das antocianinas depende também do seu pH, variando de vermelho em meio ácido a azul em meio básico, sendo mais estáveis em meio ácido. A glucose é o monossacárido mais comum ligado à aglicona, mas a galactose, arabinose e xilose também aparecem frequentemente. Os di- e trissacarídeos mais encontrados nas antocianinas são a rutinose e a sambubiose (Fernandes, 2014).

As antocianinas são intensamente coloridas sob condições ácidas, tendo uma absorção na faixa visível entre 465 e 550 nm (Fernandes, 2014). Muitas apresentam uma extraordinária estabilidade na cor devido ao efeito intramolecular da acilação do ácido hidroxicinâmico. No entanto, a sensibilidade ao pH é o principal fator limitante no processamento e utilização das antocianinas, afetando a cor e a estabilidade química (Cunha, 2014).

As antocianidinas são menos estáveis do que as antocianinas. A cianidina-3-O-glucósido, por exemplo, apresenta um tempo de semi-vida em ácido cítrico 0,01 M (pH 2,8) de 65 dias, enquanto a sua aglicona livre alcança apenas 12 horas nas mesmas condições. A temperatura é outro fator importante na estabilidade das antocianinas, uma vez que à medida que se submetem a temperaturas superiores à ambiente a sua degradação é maior (Lopes, et al., 2007).

O grau de hidroxilação tem também um efeito importante na estabilidade destes compostos: um maior número de grupos hidroxilo causa uma diminuição na sua estabilidade, enquanto o aumento do número de grupos metoxilo aumenta a estabilidade (Lopes, et al., 2007).

1.5.1. Aplicações de antocianinas na indústria

As antocianinas compõem o maior grupo de pigmentos solúveis em água do reino vegetal e são estudadas em todo o mundo como agentes de coloração natural em alimentos, sendo responsáveis pelos tons entre a coloração vermelha e a azul em muitos frutos, legumes e hortaliças (Lopes, et al., 2007).

Estas moléculas podem assim ser importantes no controlo do sabor e aspeto de vários produtos, o que pode refletir-se num aumento dos lucros, pois os preços das frutas e vegetais dependem em grande medida do seu aspeto exterior (Teixeira, et al., 2008).

Pode mesmo considerar-se que a indústria alimentar encontra nas antocianinas um importante substituinte aos corantes artificiais, indo de encontro a um público cada vez mais disposto a consumir alimentos isentos de produtos sintéticos, dando preferência ao natural e ao, alegadamente, saudável. Além do mais, são utilizados na indústria farmacêutica para o fabrico de fitoterápicos, devido ao seu potencial terapêutico (Março, et al., 2008) (Augusta, 2011), e na indústria cosmética, onde podem ser usadas em formulações, principalmente na forma de extratos naturais. A sua atividade antioxidante pode retardar o processo de peroxidação lipídica o que aumenta o interesse do ponto de vista cosmético (Augusta, 2011).

Para qualquer destas utilizações industriais, é crucial a implementação de métodos de extração mais eficientes, económicos, passíveis de ser aplicados em larga escala, e que permitam a obtenção de extratos com elevada pureza, e que ao mesmo tempo preservem a atividade biológica das moléculas-alvo (Almeida, 2016).

1.5.2. Antocianinas - um corante natural

A intensa coloração das antocianinas, associada à sua alta solubilidade em água e aos relatos crescentes dos seus benefícios para a saúde, atraem inúmeros estudos sobre a viabilidade do seu uso como corantes na indústria alimentar (Ulbricht, et al., 2014) (Ge, et al., 2013) (Hamerski, et al., 2013).

A substituição dos corantes artificiais por naturais ainda apresenta dificuldades em questões relacionadas com a estabilidade. O sucesso para o uso de corantes naturais reside em saber como controlar e processar a matéria-prima nas etapas de extração, purificação e formulação do corante, para obter alto rendimento e qualidade do produto final (Concenço, et al., 2015).

Apesar de existirem mais de 400 tipos de antocianinas em diversas fontes vegetais tais como: uva (*Vitis vinífera* L.), cereja (*Prunus avium* L.), morango (*Fragaria vesca* L.) couve-roxa (*Brassica oleracea* L.), beringela (*Solanum melongena* L.) entre outras, poucas delas se apresentam como fonte comercial desse corante (Augusta, 2011).

A produção de corantes naturais tem demonstrado o quanto é interessante investigar questões relacionadas com a viabilidade da sua produção, de modo a serem inseridos na indústria alimentar, em substituição dos sintéticos. Ao mesmo tempo, o conhecimento dos parâmetros que afetam a estabilidade dos corantes naturais, tem permitido o desenvolvimento de técnicas de pigmentação, que podem tornar estes corantes mais estáveis, facilitando e ampliando suas aplicações (Hamerski, et al., 2013).

Considerando a possível incorporação das antocianinas em alimentos, é imprescindível explorar e avaliar a cinética de degradação dessas moléculas em resultado de operações industriais ou até mesmo domésticas, como cozimento, congelamento, pasteurização, entre outros (Hamerski, et al., 2013) (Sun-Waterhouse, et al., 2013) (Oliveira, et al., 2015). Na verdade, e à semelhança de muitos outros corantes naturais, as antocianinas não são estáveis e são facilmente degradados após exposição a luz, calor ou pH, durante o armazenamento ou o processamento dos alimentos. A degradação não causa apenas o desvanecimento da intensidade de cor, mas também a perda do seu valor nutricional (Shen, et al., 2014) (Arici, et al., 2015). Durante a preparação e processamento dos alimentos, o conteúdo de antocianinas pode mesmo decrescer até 50%, quer durante a lavagem com água devido à sua solubilidade, quer pela remoção de porções dos alimentos que sejam ricas em flavonoides.

Em relação à sua aplicação em alimentos, a descoberta das antocianinas aciladas contribuiu para o avanço no uso destes pigmentos em alimentos processados, uma vez que estudos mostraram que interações moleculares entre antocianinas e outras moléculas estabilizam a cor (Hamerski, et al., 2013) (Cunha, 2014).

Tem sido demonstrado que as antocianinas interagem com a pectina através de pontes de hidrogénio ou interações hidrofóbicas e que o uso de goma-arábica melhora a cor natural das antocianinas, que são suscetíveis à degradação por ácido ascórbico, resultando numa maior estabilidade (Chung, et al., 2016).

Do ponto de vista dietético, a ingestão diária de antocianinas foi estimada entre 3-215 mg por dia, embora as estimativas mais recentes indiquem que a ingestão média de antocianinas na Europa e nos Estados Unidos está apenas na escala de 10 mg por dia (Fernandes, 2014).

1.6. Corantes

Há milhares de anos que o Homem utiliza os corantes naturais provenientes de vegetais ou de animais. Porém, com o processo de industrialização e desenvolvimento da indústria química, surgiram, no século XIX, os corantes sintetizados quimicamente, substituindo em larga escala os denominados naturais (Freitas, 2013). Os corantes usados nos alimentos fazem com que estes sejam mais apelativos e assim obtenham uma maior adesão por parte do consumidor. A sua função é conceder ao alimento uma cor diferente da natural, ou restabelecer a cor perdida por circunstâncias do seu processamento (Hamerski, et al., 2013).

Os corantes podem ser classificados em dois grandes grupos:

- Corantes orgânicos naturais, obtidos a partir de vegetais, ou eventualmente, de animais, cujo corante tenha sido isolado através de processos tecnológicos adequados. Neste grupo podem incluir-se os **corantes inorgânicos**, que são obtidos a partir de substâncias minerais e submetidos a processos de elaboração e purificação adequados à utilização em alimentos.

- Corantes orgânicos sintéticos, obtidos por síntese orgânica mediante a utilização de processos tecnológicos adequados. Este último grupo engloba **corantes artificiais**, que são corantes orgânicos sintéticos não encontrados em produtos naturais e **corantes orgânicos sintéticos idênticos aos naturais**, cuja estrutura química é a mesma do princípio ativo isolado de corante orgânico natural (Hamerski, et al., 2013).

Esta classe de compostos tem sido estudada quanto à segurança alimentar, já que nas últimas décadas muitas restrições ao uso de corantes sintéticos foram estabelecidas por organismos internacionais, como a Food and Drug Administration (FDA) e a entidade europeia equivalente (European Food Safety Authority - EFSA) (Johann, et al., 2014) ((EFSA), 2013).

Antes de ser autorizado o uso de um aditivo, deve ser feita a adequada avaliação toxicológica, considerando qualquer efeito cumulativo, sinérgico ou de proteção. Os aditivos alimentares devem ser mantidos sob observação e ser reavaliados, com base na informação científica que surja sobre o tema (Silva, et al., 2015).

De qualquer forma, a aparência visual é um dos primeiros atributo que os consumidores usam para avaliar a qualidade dos alimentos, preferindo um produto visivelmente mais apelativo, o que obriga os produtores a exercerem um esforço para melhorar a cor do produto por adição de corantes naturais ou sintéticos (Souza, 2012) (Arici, et al., 2015).

Os corantes naturais têm sido bastante utilizados na indústria alimentar sob a forma de extratos, obtidos a partir de vegetais que passaram ou não por tratamento prévio. Para se obter extratos ou isolar compostos orgânicos com este potencial, deve ter-se em consideração as características químicas das moléculas a serem purificadas e adequar as metodologias de extração e purificação (Soares, et al., 2015).

Para a preparação dos extratos onde estão presentes misturas complexas de metabolitos secundários, utilizam-se diversos solventes como etanol, metanol, hexano, água, entre outros, assim como numerosas técnicas de extração como infusão, decocção, Soxhlet, micro-ondas ou ultrassons (Soares, et al., 2015).

1.6.1. Corantes naturais vs corantes sintéticos

A toxicidade apresentada pelos corantes artificiais é a principal desvantagem do seu uso, o que os torna numa espécie de aditivo indesejável para o consumidor (Adeel, et al., 2017) (Concenço, et al., 2015). Alguns estudos sugerem mesmo que o consumo excessivo de alimentos com corantes sintéticos pode provocar diversas manifestações clínicas desde hipersensibilidade, dermatites, eczema, prurido, diarreia, náusea, vómitos, anafilaxia, asma e até mesmo cancro (Freitas, 2013) (Arici, et al., 2015).

Por outro lado, os fabricantes preferem adicionar corantes artificiais uma vez que são mais económicos, mais brilhantes, conferem uma coloração mais intensa e são mais estáveis do que os corantes naturais. No entanto, com a consciencialização e sensibilização ecológica por parte dos consumidores, os corantes naturais surgiram como uma importante alternativa aos corantes sintéticos, sendo que, as cores naturais estão presentes numa grande variedade de fontes vegetais, tais como raízes, sementes, folhas, frutos e flores (Barrozo, et al., 2013).

Deve ainda ter-se em consideração que o uso dos corantes naturais pode aumentar o custo final dos alimentos processados, apesar de, à partida, permitir produtos mais saudáveis e menos tóxicos. Além do mais, durante a extração, os corantes naturais são passíveis de sofrer oxidação, isomerização, ou formação de complexos com metais (Souza, 2012). Sendo menos intensos, poderá também ser necessário utilizar maiores quantidades, o que pode causar alterações no género alimentar (Carochoa, et al., 2015).

1.7. Bio-resíduos

O processamento de frutas e legumes gera normalmente uma quantidade apreciável de subprodutos, tais como cascas e sementes. Num esforço contínuo para reduzir ou reutilizar a quantidade de resíduos e com a crescente preocupação em proteger o ambiente, a utilização desses materiais secundários do processamento de frutas, além de diminuir o desperdício e evitar a contaminação ambiental pela eliminação desses resíduos, poderá facilitar o acesso da população a alimentos funcionais. Estes ingredientes alimentares, além de apresentarem baixo custo destacam-se também, por apresentarem propriedades bioativas interessantes (Teixeira, et al., 2014) (Kaimainen, et al., 2015). Nesta perspetiva, estes procedimentos são de elevado interesse económico, sobretudo para países com abundância de resíduos e subprodutos, visto que podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo (Brito, 2014). A utilização de bio-resíduos de frutos ou legumes tem-se alargado e são inúmeros os estudos que relatam a prática como sendo benéfica a nível económico e ambiental, podendo ser aplicadas a várias indústrias (Brito, 2014) (Farias, et al., 2014) (Davi, et al., 2014) (Melo, et al., 2015) (Teixeira, et al., 2014). Assim, os resíduos da extração de sumo de baga de sabugueiro também podem ser uma fonte alternativa de compostos fenólicos bioativos de baixo custo para posterior aplicação nas indústrias farmacêutica, alimentar e cosmética (Silva, et al., 2016).

1.8. Alimentos funcionais

A alimentação tem sido discutida e estudada como uma das grandes fontes de prevenção de doenças. Desta forma, a relação entre alimentação e saúde tem levado a estudos mais aprofundados com a finalidade de descobrir os possíveis efeitos benéficos para o funcionamento metabólico e fisiológico, descobrir benefícios para a saúde física e mental e prevenir doenças crónico-degenerativas pelo consumo de determinados alimentos (Chaves, 2014) (Gonçalves, 2014) (Rodrigues, et al., 2012).

O conceito de alimento funcional foi desenvolvido na década de 1980, no Japão, pela indústria alimentar, com a finalidade de descrever alimentos enriquecidos com ingredientes que representam benefícios para a saúde (Khan, et al., 2013). Um alimento é considerado funcional após demonstrar funções benéficas para o organismo, promovendo a saúde, além de desempenhar o seu papel nutricional básico (Chaves, 2014). Muitas outras denominações são atribuídas aos alimentos que possuem características iguais ou similares aos alimentos funcionais, entre as quais os nutracêuticos e os suplementos alimentares, que possuem como conceito central a promoção do bem-estar, da saúde ou, ainda, a redução dos riscos de doenças crónicas (Cardoso, 2016) (Basho, et al., 2010).

Os alimentos funcionais podem ser classificados em quatro grupos distintos:

- Alimentos naturalmente ricos em compostos bioativos ou os seus subprodutos;
- Alimentos que, apesar de o conhecimento científico a respeito da sua constituição química ser conhecido, não possuem validação científica dos seus efeitos benéficos para a saúde;
- Alimentos enriquecidos, que visam aumentar os teores de um componente associado à prevenção ou tratamento de várias patologias;
- Alimentos integrais, associados à redução do risco de doenças como as relativas ao trato gastrointestinal (Teixeira, et al., 2013).

Em relação ao sabugueiro enquanto alimento funcional, as bagas frescas, congeladas ou secas, estão em crescente procura, pela sua riqueza em vitaminas, antocianinas e pelas suas propriedades bioativas (Wilson, et al., 2016).

1.9. Incorporação de antocianinas em produtos de confeitaria

Existe um grande interesse no estudo das antocianinas em diversas áreas, uma vez que compõem o maior grupo de pigmentos solúveis em água do reino vegetal e são estudadas em todo o mundo como agentes da coloração natural em alimentos (Lopes, et al., 2007).

A indústria alimentar poderá ter nas antocianinas um importante substituinte aos corantes artificiais, atendendo um público cada vez mais disposto a consumir alimentos isentos de produtos químicos sintéticos, dando preferência ao natural e, em princípio, mais saudável (Março, et al., 2008) (Augusta, 2011).

As bagas de sabugueiro contêm níveis elevados de antocianinas. Na verdade, e em especial na Europa, as flores e frutos mais maduros de sabugueiro são muito utilizados na confeção de tortas, geleias, gelados, iogurtes e bebidas, tais como vinho, chá, licor e sumos (Senica, et al., 2016).

A extração do sumo das bagas origina um volume considerável de bio-resíduos (essencialmente constituídos por películas e sementes), nos quais remanesce uma quantidade apreciável de antocianinas. Este “bagaço” pode assim ser utilizado como matéria-prima para a extração de compostos de interesse, podendo estes extratos ser depois incorporados em formulações melhoradas de produtos alimentares, em especial naqueles casos em que esse produto não apresenta propriedades reconhecidamente benéficas para a saúde, como é o caso dos produtos de confeitaria. Estes produtos são considerados como uma boa fonte de energia (Kamiloglu, et al., 2017), mas o seu potencial bioativo é praticamente nulo, pelo que requerem melhorias na sua formulação (Kamiloglu, et al., 2017) (Karakaya, et al., 2016) (Chávez-Santoscoy, et al., 2016). Em estudo anteriores, as vantagens de incorporação de extratos vegetais em produtos de confeitaria, foram já avaliadas. Num estudo realizado com subprodutos de cenoura preta (*Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens*), por exemplo, constatou-se que o bagaço de cenoura preta, um produto com preço bastante acessível, pode ser utilizado como fonte de polifenóis para enriquecer produtos alimentares de confeitaria mantendo as características e estabilidade dos mesmos (Kamiloglu, et al., 2017).

Outro estudo realizado utilizando sementes de feijão preto incorporadas em bolachas sem glúten e em tortilhas, concluiu que a adição destas sementes pode ser uma estratégia para aumentar os níveis de antocianinas naqueles produtos, embora se tenha observado que as percentagens de retenção de bioativos foram mais significativas nos tortilhas. Estas percentagens possivelmente estão relacionadas com os ingredientes presentes nas bolachas assim como o seu processamento térmico (Chávez-Santoscoy, et al., 2016).

Em relação à questão da estabilidade, um estudo realizado em produtos de padaria (pão de forma, pão baguete e biscoitos) enriquecidos com antocianinas, concluiu que o cozimento e o armazenamento (temperatura ambiente) não teve influência na estabilidade das antocianinas mantendo assim as suas qualidades bioativas (Karakaya, et al., 2016).

De uma forma geral, a viabilidade da aplicação de antocianinas em produtos alimentares, deve ser acompanhada por estudos de estabilidade em diferentes condições de pH e temperatura. É também necessário saber como controlar e processar a matéria-prima para obter alto rendimento e qualidade no produto final, uma vez que o pH pode afetar a cor e a estabilidade das antocianinas, podendo estas ser degradadas em maior percentagem, proporcionalmente ao aumento da temperatura (Lopes, et al., 2007).

1.10. Objetivos

O objetivo primordial deste trabalho é conhecer as características fitoquímicas e propriedades antioxidantes que estão presentes nos resíduos das bagas de sabugueiro com vista à sua incorporação num alimento, tornando-o assim funcional. Para o estudo destas mesmas propriedades foram realizados uma série de trabalhos experimentais como extrações dos compostos bioativos, avaliação da atividade antioxidante através de ensaios como poder redutor, efeito captador de radicais livres (DPPH) e inibição da descoloração do β -caroteno.

A atividade antitumoral foi avaliada em linhas tumorais humanas de cancro de pulmão (NCI-H460), fígado (HepG2), mama (MCF-7) e cervical (HeLa), assim como a sua toxicidade em células normais de fígado de porco (PLP2), através do ensaio colorimétrico da sulforrodamina B.

Após a análise das diferentes bioatividades foi selecionada a quantidade mais apropriada de extrato a aplicar na preparação de um alimento inovador, quer do ponto de vista bioativo, quer da sua aparência visual. Assim, o objetivo específico foi a preparação de uma nova variedade de profiterole com incorporação direta de extrato de bio-resíduos de sumo de sabugueiro. A coloração conseguida foi controlada pela avaliação dos parâmetros da cor, tendo ainda sido avaliados compostos químicos individuais (açúcares livres e ácidos gordos), a composição nutricional e o perfil em antocianinas. Uma vez que era pretendido conseguir um corante natural de comprovada eficácia, foram preparados também profiteroles aditivados com corante comercial de cenoura preta, bem como outros sem qualquer adição de corante.

Em suma, pretendeu-se obter um produto de confeitaria com aspeto inovador e apresentando potenciais efeitos benéficos sobre a saúde, o que constitui uma significativa melhoria em relação ao produto tradicional.

II. Material e Métodos

2.1. Padrões e reagentes

Os padrões utilizados na atividade antioxidante, ácido gálico e catequina, foram adquiridos à Sigma (St. Louis, MO, EUA), o 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi comprado à Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA). O padrão utilizado nos ensaios de atividade antioxidante (trolox: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) foi adquirido na Matreya (PA, EUA). Todos os restantes compostos químicos e solventes utilizados eram de grau analítico, tendo sido adquiridos a fornecedores especializados. A água foi tratada através de um sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water Systems, EUA).

Para as análises cromatográficas, o acetonitrilo (grau de pureza HPLC) foi obtido da Merck KgaA (Darmstadt, Alemanha). O ácido fórmico e o ácido trifluoroacético foram adquiridos à Prolabo (VWR International, França). Os padrões de compostos fenólicos foram fornecidos pela Extrasynthese (Genay, França).

Nos ensaios efetuados com culturas celulares, o dimetilsulfóxido (DMSO), de grau analítico, foi comprado à Fisher Scientific (Paris, França). O soro fetal bovino (FBS), a L-glutamina, a solução salina equilibrada de Hank (HBSS), as soluções de tripsina-ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (100 U/mL) e de penicilina/estreptomicina (100 mg/mL) e os meios Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 e Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) foram fornecidos pela Hyclone (Logan, EUA). Os outros componentes utilizados, ácido acético, elipticina, sulforrodamina B (SRB), azul de tripano, ácido tricloroacético (TCA) e Tris, foram comprados à Sigma Chemical Co. (Saint Louis, EUA).

O corante comercial utilizado para comparação foi adquirido na C.H.R Hansen.

2.2. Recolha e preparação de amostras

As bagas de sabugueiro foram obtidas na orla do rio Fervença em Bragança, tendo sido apanhadas no estado de maturação completa (bagas pretas brilhantes). Após a obtenção do sumo por extração mecânica simples, os bio-resíduos resultantes, especificamente películas e sementes inteiras, foram congelados, liofilizados, triturados (20 mesh) e guardados em local seco e ao abrigo da luz para posterior análise.

2.3. Procedimentos de extração das amostras

2.3.1. Maceração

A extração das amostras (1 g) foi feita através de maceração (água) (30 mL), sob agitação magnética (150 rpm), à temperatura ambiente (25 °C) durante uma hora. O preparado foi filtrado através de um filtro de papel Whatman N° 4 para repetição do procedimento.

A solução extraída foi congelada, liofilizada e determinada a massa de extrato obtido para a preparação de uma solução-mãe (20 mg/mL), posteriormente diluída em diferentes concentrações: 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL, 0,3125 mg/mL, 0,15625 mg/mL, 0,078125 mg/mL e 0,0390625 mg/mL) e posteriormente submetidas aos diversos ensaios.

2.3.2. Ultrassons

As amostras do bagaço liofilizadas e trituradas foram colocadas num gobelé (3 g) juntamente com o solvente (água) (100 mL). A mistura foi extraída por ultrassom (QSonica sonicators, model CL-334, Newtown, CT, USA), a diferentes frequências (250 kHz, 375 kHz e 500 kHz) e a diferentes tempos de extração (5 min, 10 min e 20 min). Seguidamente à extração, as soluções foram filtradas com auxílio de um papel de filtro Whatman N°4 e congeladas para posterior análise.

2.4. Ensaios de avaliação da atividade antioxidante

2.4.1. Poder Redutor

A cada uma das diferentes soluções de extrato (0,5 mL) foi adicionada (0,5 mL) uma solução tampão de fosfato de sódio (200 mmol/L, pH 6,6) e ferricianeto de potássio 1% (0,5 mL). Após as misturas terem sido incubadas a 50 °C durante 20 minutos, foi incorporado ácido tricloroacético 10% (0,5 mL). A este sobrenadante foi retirado um volume de 0,8 mL para uma microplaca, juntamente com água desionizada (0,8 mL) e 160 µL de cloreto de ferro III (0.1%).

Foi preparado um controlo com solvente de extração em vez da solução de extrato para posterior comparação.

A leitura das absorvâncias foi realizada num leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc.) a 690 nm. A concentração de extrato com correspondente a uma absorvância de 0,500 (EC₅₀) foi calculada a partir do gráfico de absorvância a 690 nm em função da concentração do extrato.



Figura 8- Leitor de microplacas para leitura das absorvâncias.

2.4.2. Atividade captadora de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

De cada uma das diferentes soluções de extrato (gama de 2,5 mg/mL a 0,0390625 mg/mL) foram retirados 30 μ L e adicionados 270 μ L de uma solução metanólica contendo radicais de DPPH (6×10^{-5} mol/mL). Foi preparado um controlo com solvente de extração em vez da solução de extrato para posterior comparação. A mistura foi preservada ao abrigo da luz e após 60 minutos foi determinada a redução do radical DPPH no leitor de microplacas referido em 2.4.1. a 515 nm. A atividade captadora de radicais (ACR) foi calculada através da percentagem de descoloração da solução de DPPH usando a seguinte equação:

$$\%ACR = [(A_{DPPH} - A_S) / A_{DPPH}] \times 100$$

A_S corresponde à absorvância da solução de DPPH na presença de diferentes concentrações de extrato e A_{DPPH} corresponde à absorvância do controlo.

A concentração de extrato que corresponde a 50% da atividade captadora de radicais (EC_{50}) foi calculada a partir do gráfico de ACR em função da concentração de extrato.

2.4.3. Inibição da descoloração do β -caroteno

Foi preparada uma solução de β -caroteno dissolvendo 2 mg do composto em 10 mL de clorofórmio. Desta solução foram pipetados 2 mL para um balão e procedeu-se à evaporação do clorofórmio num evaporador rotativo a 40 °C. Aos 0,2 mg de β -caroteno resultantes, foram adicionados 400 mg do emulsificador Tween 80, 40 mg de ácido linoleico e 100 mL de água destilada, agitando vigorosamente até emulsionar. Posteriormente, desta emulsão, foram transferidos 4.8 mL para um tubo de ensaio contendo 0.2 mL das diferentes concentrações do extrato (gama de 2,5 mg/mL a 0,0390625 mg/mL). Foi preparado também um controlo com solvente de extração em vez da solução de extrato para posterior comparação.

Os tubos foram agitados (vortex) e incubados a 50 °C em banho-maria, sob agitação (50 rpm). Logo que a emulsão foi adicionada a cada tubo, a absorvância foi medida (tempo zero) a 470 nm (espectrofotómetro AnalytikJena 200-2004), tendo sido novamente medida no final da incubação. A inibição da descoloração do β -caroteno foi calculada utilizando a equação:

$$[(A_{470}T_{120} / A_{470}T_0) \times 100]$$

onde, $A_{470} T_{120}$ corresponde ao valor de absorvância obtido duas horas após incubação e $A_{470} T_0$ ao valor de absorvância inicial. A concentração de extrato que corresponde a 50% de atividade antioxidante (EC50) foi calculada a partir do gráfico de percentagem da inibição da descoloração do β -caroteno em função da concentração da amostra.

2.5. Ensaio da atividade inibitória do crescimento de linhas celulares tumorais humanas

Para estes ensaios, o extrato de “bagaço” de sabugueiro foi inicialmente diluído em água de modo a obter uma concentração de 10 mg/mL e, em seguida submetido a diluições sucessivas (10-0,15625 mg/mL).

O ensaio da sulforrodamina B (SRB) é um dos processos mais utilizados para o rastreio *in vitro* de citotoxicidade. Este método quantifica o número de células através de marcação do seu conteúdo proteico, tendo a vantagem de permitir estudar células isoladas sem a necessidade de testes em animais. O ensaio baseia-se na capacidade da SRB (uma aminoxantina com cor rosa-brilhante) para se ligar a componentes proteicos de células, que foram fixadas em placas de cultura, com a ajuda de ácido tricloroacético (Vichai, et al., 2006). Utilizaram-se linhas tumorais HeLa (carcinoma cervical), MCF-7 (adenocarcinoma da mama), NCI-H460 (cancro do pulmão de células não-pequenas), HepG2 (carcinoma hepatocelular) e ainda células normais de fígado de porco (PLP2).

As células foram cultivadas numa incubadora de ar humidificado e com 5% de CO₂, em frascos de cultura de tecidos de 25 cm² e suplementadas com DMEM com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100

mg/mL de estreptomina. Foi efetuada uma monitorização contínua das células num microscópio de contraste de fase (Icon Eclipse Ts 100). Para preparar o ensaio, começou-se por retirar o meio de cultura do frasco de cultura com as células, e lavou-se com solução salina (HBSS, 2 mL). Descartou-se o meio de lavagem e adicionou-se tripsina (2,5 mL), para desagregar as células da caixa de cultura durante três minutos em incubação. De seguida adicionou-se meio de cultura (5 mL) de modo a neutralizar a ação da tripsina, e colocou-se a suspensão da linha celular em tubos de Falcon estéreis para centrifugar (5 min). Descartou-se o meio de cultura com tripsina, e retirou-se a suspensão celular (75 μ L) para um eppendorf à qual se juntou a mesma quantidade (75 μ L) de azul tripano para se proceder à contagem de células numa câmara de Neubauer.

Posteriormente, colocaram-se os extratos (10 μ L) em microplacas de 96 poços juntamente com o volume de suspensão celular calculado para a densidade estabelecida, e perfez-se o volume do poço com meio de cultura. Após isto, as microplacas armazenaram-se devidamente seladas durante 72 horas a 37 °C com humidade e 5% de CO₂. Já com as células devidamente aderidas, desprezou-se o conteúdo da microplaca, e deu-se início ao teste da SRB pela adição de ácido tricloroacético frio (10%, 100 μ L) a cada um dos poços e pela incubação a 4 °C por 60 minutos. Após isto, lavaram-se devidamente com água destilada e as microplacas foram colocadas a secar. Adicionou-se então a SRB (0,1 em 1% ácido acético; 100 μ L) incubando de seguida durante 30 minutos à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada, desta vez com ácido acético (1%) de modo a retirar cuidadosamente o excesso SRB e deixou-se secar. Solubilizou-se a SRB com Tris (200 μ L, pH 7,4) com auxílio a um agitador de microplacas (Stat Fax-2100), e procedeu-se a leitura da absorvância no leitor de microplacas referido previamente. Os resultados foram expressos pela fator de diluição do sumo que inibiu 50% do crescimento celular (GI₅₀). Todos estes processos e operações foram efetuados em ambiente asséptico numa câmara de fluxo laminar vertical (TLStar, AV-30/70)

2.6. Análise cromatográfica de antocianinas

A análise das antocianinas presentes nos extratos de “bagaço” de sabugueiro (e posteriormente nas amostras de profiteroles) foi feita em amostras liofilizadas (1 g) extraídas com 30 mL de metanol contendo 0,5% de TFA durante aproximadamente 1 hora. Os extratos foram depois filtrados através de um filtro de papel Whatman nº 4, repetindo depois o mesmo processo com os resíduos. Os extratos combinados foram evaporados a 35 °C para remover o metanol e redissolvidos em água. Na etapa de purificação, os extratos foram tratados num cartucho C18 (SepPak®Vac Phenomenex), previamente ativado com metanol e depois com água. Os açúcares e as substâncias mais polares foram removidos passando 15 mL de água e os pigmentos antociânicos foram eluídos com 5 mL de metanol/água (80:20, v/v) contendo 0,1% de TFA. O extrato metanólico foi concentrado sob vácuo, liofilizado, redissolvido em 1 mL de solução aquosa de metanol (20%) e filtrado através de um disco LC descartável de 0,22 µm para análise por HPLC.

A separação cromatográfica foi conseguida numa coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18, (3 µm, 4,6 mm x 150 mm) de fase reversa termostaticada a 35 °C. Os solventes usados foram: (A) 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) em água, (B) acetonitrilo. A eluição em gradiente seguiu os seguintes parâmetros: 10% de B durante 3 min, de 10 a 15% de B durante 12 min, 15% de B durante 5 min, de 15 a 18% de B durante 5 min, de 18 a 30% de B durante 20 min, de 30 a 35% de B durante 5 min e de 35 a 10% durante 10 min.

O tempo total de execução resultante foi de 60 minutos, seguido por acondicionamento de coluna de 10 minutos, utilizando um caudal de 0,5 mL/min. A dupla deteção em linha foi realizada no DAD utilizando 520 nm como o comprimento de onda preferido e num espectrómetro de massa (MS) ligado ao sistema HPLC através da saída da célula DAD.

A deteção de MS foi realizada em modo positivo, utilizando um espectrómetro de massa Linear Ion Trap LTQ XL (Thermo Finnigan, San Jose, CA, EUA) equipado com uma fonte ESI. O azoto serviu como gás envolvente (50 psi), e o sistema foi operado com uma tensão de pulverização de 4,8 kV, uma temperatura de fonte de 320 °C e uma tensão capilar de 14 V.

O deslocamento da lente do tubo foi mantido a uma tensão de 75 V, tendo sido analisada a gama de massas de m/z 100 a 1500. A energia de colisão utilizada foi de 20 (unidades arbitrárias). A aquisição dos dados foi realizada com o sistema de dados Xcalibur® (Thermo Finnigan, San Jose, CA, EUA).

As antocianinas presentes nas amostras foram caracterizadas de acordo com o seu espetro UV e de massa, e tempo de retenção por comparação com padrões, quando disponíveis. Para análise quantitativa, obtiveram-se as curvas de calibração (cianindina-3-O-glucósido ($y = 243287x - 1E+06$; $R^2=0.995$; $LOD=1.3 \mu\text{g/mL}$; $LOQ=4.32 \mu\text{g/mL}$) por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas (0,25-50 g/mL). Os resultados foram expressos em $\text{mg/g}_{\text{extrato}}$.



Figura 9- Equipamentos utilizados na identificação de antocianinas. HPLC-MS.

2.7. Incorporação do extrato no alimento

A massa choux é uma preparação clássica da *pâtisserie* francesa. É uma massa versátil, pois pode ser utilizada na preparação de doces e de salgados, muito utilizada na área de panificação e confeitaria e tem boa aceitabilidade no mercado consumidor (Giaretta, et al., 2015), tendo sido por isso o produto selecionado para este estudo.

2.7.1. Preparação da massa choux

Os ingredientes utilizados na receita base foram: água (50 mL), farinha (75 g), manteiga (30 g), açúcar (5 g), sal (2,5 g), ovos (2) e extrato de sabugueiro. Em primeiro lugar, colocou-se a água, o sal e a manteiga e aqueceu-se até à ebulição. De seguida, adicionou-se, de uma só vez, a farinha e mexeu-se vigorosamente. Depois de arrefecida a massa, os ovos foram adicionados um a um e por fim incorpora-se o extrato nas concentrações pré-determinadas.

Com o auxílio de um saco de pasteleiro, foram dispostas porções com o tamanho aproximado de uma noz, num tabuleiro previamente forrado com papel manteiga, levando-se de seguida a cozer em forno pré-aquecido a 200 °C, durante 20 minutos.

2.7.2. Preparação do merengue italiano (recheio)

Uma das inovações propostas neste trabalho foi a adição de extrato de sabugueiro, quer à massa, quer ao recheio. Para este, foi preparado um merengue do tipo italiano, utilizando: açúcar (150 g), água (50 mL) claras de ovo (2), extrato de sabugueiro e sumo de limão (5 mL).

Começou por separar-se as claras de ovo, que foram de seguida batidas (com uma batedeira elétrica) a uma velocidade baixa durante cerca de 2 minutos. Em simultâneo, colocou-se o açúcar a aquecer juntamente com a água, até atingir uma temperatura 116 °C e 118 °C. Esta calda (em ponto pérola), foi adicionada às claras batidas em fio, com cuidado, e batendo continuamente até obter a típica consistência “em castelo”. Por fim, foi adicionado o sumo de limão e o extrato de sabugueiro, mexendo até obter uma mistura homogénea.

2.8. Caracterização química dos profiteroles

Os diferentes tipos de profiterole foram caracterizados quanto aos teores em humidade, cinzas, gordura, proteínas, hidratos de carbono (calculados por diferença) e correspondente valor energético [Energia, kcal = $4 \times (g_{\text{proteína}} + g_{\text{hidratos de carbono}}) + 9 \times (g_{\text{lípidos}})$]. Foram também avaliados os perfis em açúcares livres, ácidos gordos e antocianinas (o parâmetro mais importante tendo em vista os objetivos do trabalho). De forma a validar a alteração de cor obtida, foram também medidos os parâmetros de cor L^* (luminosidade), a^* (intensidade da cor vermelha) e b^* (intensidade da cor azul).

2.8.1. Teor de humidade

Para a determinação do teor de humidade pesou-se a amostra (1 g) preparada previamente para cadinhos previamente calcinados e pesados que foram colocados na estufa (Memmert; UNB 100-500) a 100 °C até obter um peso constante. Os resultados obtiveram-se pela seguinte expressão: $\text{Teor de humidade} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100$

Em que m_i representa a massa inicial colocada nos cadinhos, e m_f faz referência à massa após obter um peso constante.

2.8.2. Teor de cinzas

Para a determinação da matéria mineral, pesou-se a amostra (250 mg) para cadinhos calcinados e pesados e introduziram-se na mufla (Lenton Thermal designs limited; ECF12/22), deixando incinerar durante a noite (600 °C). Arrefeceram-se os cadinhos num exsiccador e mediu-se o peso.

Os resultados foram expressos em percentagem de cinzas total, segundo a seguinte expressão: $\% \text{ cinzas} = \frac{m_f}{m_i} \times 100$

Em que a massa inicial é representada por m_i e a massa final por m_f , correspondente aos resíduos após incineração na mufla.

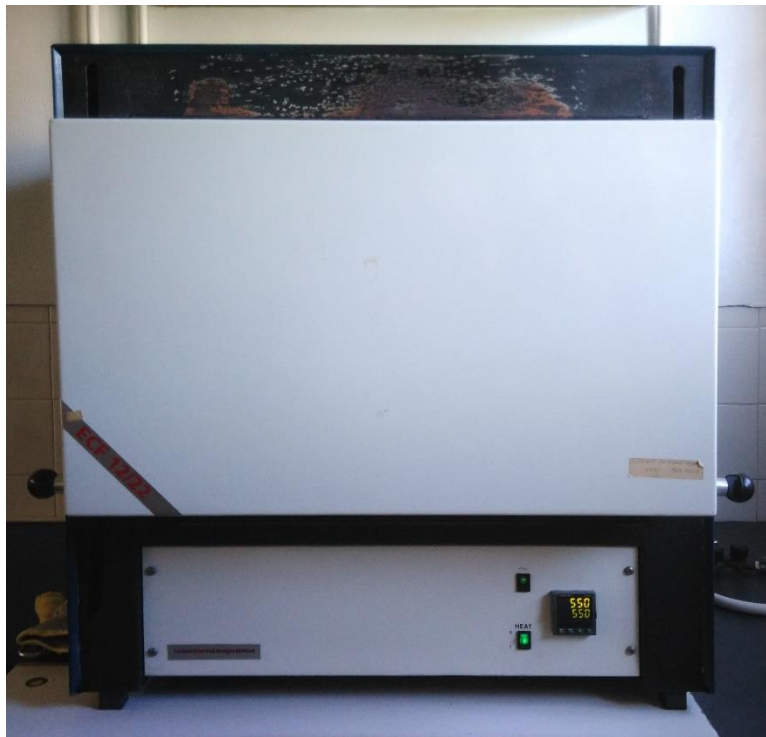


Figura 10- Mufla utilizada para a incineração das amostras

2.8.3. Determinação do teor em gordura

Os lípidos foram extraídos com um equipamento de Soxhlet, usando éter de petróleo como solvente. A amostra (3 g) foi colocada num cartucho poroso e colocado na câmara de extração. Após 8 horas, a extração foi interrompida e removeu-se o balão contendo a a gordura solubilizada no éter de petróleo. Evaporou-se então o solvente, e o teor em gordura foi determinado após secagem na estufa a 100 °C até peso constante. Os resultados foram apresentados em percentagem de gordura, segundo a expressão:

$$\% \text{ gordura} = \frac{mf}{mi} \times 100$$

Em que a massa inicial da amostra é representada por mi e a massa final por mf , correspondente à massa de gordura obtida no balão.



Figura 11- Equipamento Soxhlet utilizado para extração de gorduras.

2.8.4. Determinação do teor em proteína pelo método de Kjeldahl

É a partir do azoto existente nas proteínas que surge o processo mais comum para análise do teor de proteína total. O método de Kjeldahl permite quantificar o teor em proteína bruta baseado no teor em azoto da amostra. Pesou-se a amostra (1 g) previamente liofilizada e moída, e introduziu-se no tubo de digestão com 15 mL de ácido sulfúrico concentrado e duas pastilhas de selénio como catalisadores da digestão. Os tubos foram colocados no digestor (Foss™ Digestor) durante aproximadamente 2h a 410 °C. Após arrefecimento, os tubos de digestão foram colocadas no equipamento de Kjeldahl, que automaticamente realiza uma destilação e uma titulação. Inicialmente ocorre uma diluição da amostra com água e a neutralização do ácido sulfúrico com uma solução de hidróxido de sódio, posteriormente ocorre uma destilação da solução que contém o amoníaco, que o arrasta por vapor para uma outra solução, contendo ácido bórico, azul-de-metileno e vermelho de metilo, onde o amoníaco é recolhido.

Dá-se então a titulação onde o ião borato, existente numa quantidade proporcional à de azoto, é titulado com uma solução padrão de ácido clorídrico, que permite calcular a quantidade molar em azoto na amostra. O teor em proteína foi depois calculado multiplicando o valor obtido para o azoto por um fator de conversão específico selecionado no aparelho.

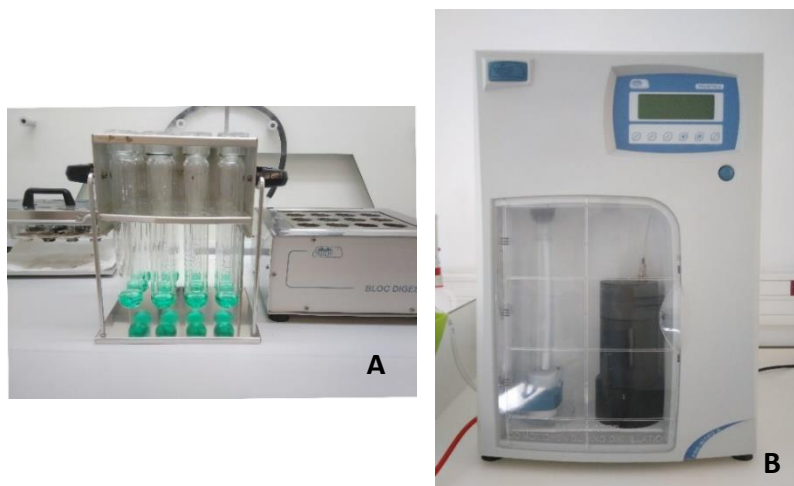


Figura 12-Equipamentos utilizados para determinação de teor de proteínas. A-Digestor, B-Equipamento Kjelhdal

2.8.5. Cálculo do teor em hidratos de carbono e valor energético

O teor em hidratos de carbono foi calculado pela diferença dos componentes quantificados anteriormente, humidade, cinzas, gordura e proteína, utilizando a seguinte expressão:

$$\% \text{ hidratos de carbono} = 100 - (\% \text{ água} + \% \text{ proteínas} + \% \text{ lípidos} + \% \text{ cinzas})$$

2.8.6. Determinação da cor

A fim de validar as alterações de cor conseguidas de acordo com as distintas percentagens de sumo, foi utilizado um colorímetro (modelo CR-400, Konica Minolta Sensing Inc., Tóquio, Japão), para medição dos parâmetros L^* , a^* e b^* (CIELAB), em que: L^* indica a luminosidade; a^* varia de valores negativos (verde) a valores positivos (vermelho) e b^* varia de azul (valores negativos) a amarelo (valores positivos) (Delgado, et al., 2014).

2.8.7. Determinação do perfil de ácidos gordos por cromatografia gasosa

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa (Dani; modelo GC1000) equipado com detetor de ionização por chama (FID) a 260 °C. Após extração por Soxhlet, os ácidos gordos foram metilados com metanol:ácido sulfúrico:tolueno 2:1:1 (v:v:v) durante um período mínimo de 12 h num banho a 50 °C e 160 rpm. De seguida, foi adicionada água desionizada para promover a separação de fases e os esteres metílicos de ácidos gordos (FAME) foram recuperados com éter dietílico por agitação em vortex. O sobrenadante foi então desidratado com sódio de sulfato anidro e filtrado através de filtros de nylon (0.2 µm) para posterior injeção. A análise foi levada a cabo num cromatógrafo gasoso DANI (modelo GC 1000) equipado com um injetor split/splitless, um detetor de ionização em chama (FID) a 260 °C e uma coluna Macherey-Nagel (30 m × 0.32 mmID × 0.25 µm df). O programa de temperaturas do forno foi estabelecido previamente (Pereira, et al., 2011).

A identificação foi feita por comparação dos tempos de retenção dos FAME com padrões comerciais. Os resultados foram processados com o software CSW 1.7 (DataApex 1.7) e expressos em percentagem relativa de cada aminoácido.

2.8.8. Açúcares

A composição em açúcares foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência com um detetor de índice de refração (HPLC-RI). Para isso colocou-se a amostra (1 g) num tubo de falcon, juntamente com um padrão interno, melezitose (25 mg/mL) e extraiu-se com etanol (80%, 40 mL) durante 1h30min a 80°C agitando a cada 15 min. Centrifugou-se a amostra e os vestígios de gorduras foram retirados em lavagens sucessiva com éter etílico (10 mL). Os resíduos foram dissolvidos em água para perfazer um volume final de 5 mL. A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna 100-5 NH2 Eurospher (4,6 × 250 mm, 5 mm, Knauer) operando a 30 °C (forno Grace 7971 R). A fase móvel foi acetonitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v) com um caudal de 1 ml/min. Os açúcares foram identificados pela comparação dos tempos de retenção

relativos dos picos das amostras com os padrões, e os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca.



Figura 13- Equipamento usado para a identificação de açúcares. HPLC-RI

2.9. Análise estatística

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

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

III. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização bioativa dos extratos de “bagaço” de sabugueiro

Por forma a avaliar a eventual influência do processo de extração no rendimento em antocianinas e nos níveis de bioatividade, foram testados três tipos de extração distintos: maceração com água, maceração com etanol e ultrassons.

Em relação aos perfis em antocianinas, foram detetados 3 compostos distintos, todos derivados da cianidina: cianidina-3-*O*-sambubiósido-5-*O*-glucósido, cianidina-3-*O*-sambubiósido e cianidina-3-*O*-glucósido. A cianidina-3-*O*-glucósido foi identificada por comparação com o padrão comercial, enquanto os outros dois compostos foram confirmados por comparação das características cromatográficas e espectrais (UV e massa) com dados da nossa biblioteca de compostos e com a literatura disponível (Silva, et al., 2016) (Duymus, et al., 2014). Como pode verificar-se na **tabela 4**, o processo de extração não exerceu influência significativa (valor de $p > 0.05$) na quantidade de antocianinas extraídas, pelo que se optou por selecionar a extração tecnologicamente mais simples e mais de acordo com as premissas da Química Verde: maceração com água. A cianidina-3-*O*-sambubiósido (32 ± 1 mg/mL) foi a antocianina maioritária, seguida da cianidina-3-*O*-glucósido (32 ± 1 mg/mL), com valores similares, e da cianidina-3-*O*-sambubiósido-5-*O*-glucósido. Em geral, os bio-resíduos resultantes da extração de sumo de sabugueiro revelaram elevado potencial para a obtenção de antocianinas.

Tabela 4- Antocianinas (mg/g de extrato) quantificadas no “bagaço” do sumo de sabugueiro.

	Cianidina-3-O-sambubiósido- 5-O-glucósido	Cianidina-3-O- sambubiósido	Cianidina-3-O- glucósido
Maceração com água	5,4±0.2	32±1	24±1
Maceração com etanol	6,0±0.5	30±2	24±1
Ultrassons	5,9±0.5	31±2	24±1
Homoscedasticidade ² (valor de <i>p</i>) (n = 27)	0,002	0,930	0,039
ANOVA ² (valor de <i>p</i>) (n = 27)	0,165	0,309	0,433

¹Valores de *p* inferiores a 0,05 indicam distribuições heteroscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tamhane's T2; valores de *p* superiores a 0,05 indicam distribuições homoscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tukey HSD. ²Se o valor de *p* for inferior a 0,05, o parâmetro correspondente apresenta diferenças significativas para pelo menos um dos tipos de extrato (identificadas com letras diferentes).

Em relação à bioatividade, os extratos de “bagaço” resultante do sumo de sabugueiro foram avaliados quanto à atividade antioxidante e citotoxicidade. Como poderia de alguma forma ser antecipado, tendo em consideração os teores de antocianinas e sabendo que estas possuem um grande potencial antioxidante, todos os extratos apresentaram uma significativa atividade antioxidante, em especial quando avaliada quanto à capacidade de bloqueio de radicais DPPH e ao poder redutor (**tabela 5**). Em termos de comparação entre os diferentes extratos, verificaram-se diferenças apenas nos casos do DPPH e poder redutor, curiosamente com os extratos aquosos a demonstrar maior atividade de bloqueio de radicais, mas simultaneamente o menor poder redutor. De todas as formas, ficou comprovado, à semelhança do que já tinha sido verificado com bio-resíduos industriais (em particular nos pecíolos) que os subprodutos de sabugueiro possuem um grande potencial antioxidante (Silva et al., 2017).

Por outro lado, os extratos ensaiados no presente trabalho não apresentaram citotoxicidade até às máximas concentrações ensaiadas (500 µg/mL) nas linhas celulares utilizadas (MCF-7, NCI-H460, HeLa, HepG2 e PLP2), à exceção do que foi observado com os extratos aquosos quanto ao seu efeito inibidor sobre a linha HeLa, de acordo com a GI₅₀ de 393 µg/mL.

Tabela 5- Atividade antioxidante dos diferentes extratos de “bagaço” do sumo de sabugueiro. Os resultados são apresentados como valores de EC₅₀, em mg/mL.

	Bloqueio de radicais DPPH	Poder redutor	Inibição da descoloração do β-caroteno
Maceração com água	0,22±0,02 c	0,39±0,03 a	1,2±0,1
Maceração com etanol	0,26±0,03 b	0,33±0,02 b	1,1±0,1
Ultrassons	0,34±0,04 a	0,32±0,02 b	1,0±0,2
Homoscedasticidade ¹ (valor de <i>p</i>) (n = 27)	<0,001	0,415	0,067
ANOVA ² (valor de <i>p</i>) (n = 27)	<0,001	<0,001	0,062

¹Valores de *p* inferiores a 0,05 indicam distribuições heteroscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tamhane’s T2; valores de *p* superiores a 0,05 indicam distribuições homoscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tukey HSD. ²Se o valor de *p* for inferior a 0,05, o parâmetro correspondente apresenta diferenças significativas para pelo menos um dos tipos de extrato (identificadas com letras diferentes).

3.2. Caracterização das novas formulações de profiterole

Nesta segunda secção do trabalho foram preparadas três formulações de profiteroles. Uma das formulações (PB) corresponde à receita base, não apresentando qualquer corante, nem na massa, nem no recheio; a segunda formulação (PBS) foi aditivada (4% da massa total, quer na massa, quer no recheio) com o extrato de “bagaço” de sabugueiro obtido por maceração com água; uma terceira formulação (PCC) foi também adicionada com 4% de um corante de cenoura comercial, previamente diluído até ter a mesma absorvância do extrato de sabugueiro.



Figura 14- Diferentes formulações de profiteroles. A-receita base (PB), B-receita aditivada com extrato de “bagaço” de sabugueiro (PBS), receita aditivado com corante comercial (PCC).

Para comparar as diferentes formulações de profiterole, caracterizou-se a sua composição nutricional, perfil em açúcares livres e em ácidos gordos e também os parâmetros de cor: L^* , a^* e b^* . De forma a avaliar, a eficiência de incorporação dos extratos ricos em antocianinas, os profiteroles foram ainda extraídos (procedimento descrito em 2.6.), sendo posteriormente quantificado o seu teor em antocianinas.



Figura 15-Diferentes formulações de profiteroles com recheio. A-receita base (PB), B-receita aditivada com extrato de "bagaço" de sabugueiro (PBS), receita aditivado com corante comercial (PCC).

3.2.1. Composição nutricional

A **tabela 6** mostra os valores médios, em g/100 g de produto fresco, obtidos para a composição nutricional, açúcares livres e valor energético das formulações analisadas. Para todos os parâmetros, exceto o teor em cinzas, verificaram-se algumas diferenças significativas (valores assinalados com letras diferentes), apesar da relativa proximidade entre todos os valores. Os hidratos de carbono são o componente mais abundante ($\approx 60\%$), seguido pela gordura ($\approx 20\%$) e as proteínas ($\approx 10\%$). Segundo o regulamento da União Europeia as doses de referência de nutrientes, numa dieta de 2000 kcal, o valor de lípidos totais deve ser de 90 g, valores de ácidos gordos saturados 20 g, hidratos de carbono 260 g, açúcares 90 g, e de proteínas 50 g (Conselho, 2011).

Dado que o produto foi cozido a 200 °C, o teor em água é pouco mais do que residual. Como é típico neste tipo de produtos, o valor energético é elevado.

Em relação ao perfil em açúcares livres (**tabela 6**), foi apenas detetada a glucose, embora em quantidades muito baixas e a sacarose, que como pode constatar-se pelos valores tabelados, corresponde a praticamente metade da percentagem total em hidratos de carbono. Em geral, pode afirmar-se que a introdução do extrato de sabugueiro (à semelhança do observado com o corante comercial de cenoura) não causou alterações relevantes no perfil nutricional dos profiteroles.

Tabela 6- Composição nutricional, açúcares livres (g/100 g) e valor energético (kcal/100 g) das diferentes formulações de profiteroles.

	Água	Gordura	Proteínas	Hidratos de carbono	Glucose	Sacarose	Cinzas	Energia
PB	1,0±0,1 b	24±1 a	14,1±0,3 a	60±1 b	0,36±0,02 a	28±1 b	1,6±0,1	508±3 a
PBS	1,2±0,1 a	21±2 b	13,3±0,1 b	63±2 a	0,30±0,04 b	31±1 a	1,7±0,3	492±8 b
PCC	1,0±0,1 b	24±1 a	13,8±0,4 a	59±1 b	0,37±0,03 a	26±2 c	1,5±0,1	512±2 a
Homoscedasticidade ¹ (valor de <i>p</i>) (n = 27)	0,103	0,002	<0,001	0,010	0,107	<0,001	<0,001	0,002
ANOVA ² (valor de <i>p</i>) (n = 27)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,192	<0,001

¹Valores de *p* inferiores a 0,05 indicam distribuições heteroscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tamhane's T2; valores de *p* superiores a 0,05 indicam distribuições homoscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tukey HSD. ²Se o valor de *p* for inferior a 0,05, o parâmetro correspondente apresenta diferenças significativas para pelo menos um dos tipos de extrato (identificadas com letras diferentes).

3.1.1. Ácidos gordos

Como primeira nota, refira-se que para além dos ácidos gordos listados na **tabela 7**, foram ainda detetados C11:0, C13:0, C14:1, C15:0, C17:0, C18:3n6, C18:3n3, C20:0, C20:1, C20:3n6, C20:3n3, C22:0, C22:6n3 e C24:0, porém em todos casos em percentagens inferiores a 1%. Em relação aos ácidos gordos maioritários, e apesar de terem sido verificadas algumas diferenças significativas na maioria dos casos, exceto para o C18:2 e os ácidos gordos saturados (AGS), todas as formulações preparadas apresentaram perfis similares. As duas formas mais abundantes foram o ácido palmítico e o ácido oleico, com percentagens próximas dos 30%, sendo ainda de assinalar os valores obtidos para o ácido esteárico e o ácido linoleico, que se aproximaram dos 10%. No que diz respeito aos ácidos gordos totais os maioritários são os ácidos gordos saturados (AGS) (57%); AGS> AGMI> AGPI.

Sabe-se que os ácidos gordos omega-3 (AGPI) derivam do ácido linolénico, que se obtém através do peixe e de algumas plantas, os omega-6 (AGPI) do ácido linoleico, que se obtém através da maioria dos óleos vegetais e ainda outro grupo, os ácidos gordos omega-9 (AGPI), que derivam do ácido oleico, são os mais saudáveis uma vez que estão associados à diminuição de risco de doenças inflamatórias, hipertensão e doenças cardíacas. (Yates, et al., 2014) (Nestel, et al., 2015) Por outro lado, o consumo excessivo de gordura saturada está associado ao aumento do risco de doenças dos aparelhos circulatório e cardíaco e aumento do colesterol sanguíneo, particularmente do colesterol LDL; recomenda-se então, que a ingestão de gorduras saturadas não ultrapasse os 10% do valor energético total. (Candeias, et al., 2005)

Tabela 7-Composição em ácidos gordos (%) dos profiteroles (média ± desvio-padrão).

	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C20:5n3	AGS	AGMI	AGPI
PB	1,3±0,1 b	0,8±0,1 b	2,0±0,1 b	2,5±0,1 b	7,7±0,1 b	31±1 a	2,1±0,1 a	9,5±0,1 a	29±1 a	9,9±0,1	0,15±0,01 b	57±1	32±1 a	11,7±0,4 b
PBS	2,6±0,5 a	1,1±0,1 a	2,2±0,1 a	2,6±0,1 a	7,8±0,1 a	30±1 ab	2,0±0,1 b	9,3±0,1 b	28±1 ab	9,9±0,2	1,2±0,1 a	57±1	30±1 b	12,1±0,2 a
PCC	2,7±0,5 a	1,1±0,1 a	2,2±0,1 a	2,6±0,1 a	7,8±0,1 a	30±1 b	2,0±0,1 b	9,3±0,1 b	28±1 b	9,8±0,2	1,2±0,1 a	57±1	31±1 ab	12,0±0,2 a
Homoscedasticidade ¹ (valor de <i>p</i>) (n = 27)	<0,001	0,001	0,312	0,001	<0,001	0,221	<0,001	<0,001	0,001	0,001	0,001	0,009	<0,001	0,006
ANOVA ² (valor de <i>p</i>) (n = 27)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,017	<0,001	<0,001	0,042	0,072	<0,001	0,161	0,006	<0,001

¹Valores de *p* inferiores a 0,05 indicam distribuições heteroscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tamhane's T2; valores de *p* superiores a 0,05 indicam distribuições homoscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tukey HSD. ²Se o valor de *p* for inferior a 0,05, o parâmetro correspondente apresenta diferenças significativas para pelo menos um dos tipos de extrato (identificadas com letras diferentes).

3.1.2. Parâmetros de cor

Para além dos aspetos nutricionais e dos componentes individuais discutidos nas secções anteriores, a análise dos parâmetros de cor (**tabela 8**), nomeadamente, L^* , a^* e b^* , tem uma relevância acrescida, considerando que um dos primeiros objetivos era precisamente conseguir um a nova formulação do alimento em estudo, que resultasse mais apelativa para o consumidor. Começando pelo aspeto exterior, a adição dos dois tipos de corante, quer o extrato aquoso de “bagaço” de sabugueiro, quer o corante comercial de cenoura preta, diminuiram ligeiramente a luminosidade (L^*), tendo em contrapartida aumentado a intensidade da tonalidade vermelha (a^*), embora de forma não muito significativa, o que pode justificar-se pelo escurecimento induzido pelo processo de cocção. Quanto ao parâmetro b^* , foi também notório que os profiteroles controlo apresentaram uma tonalidade mais marcadamente amarela, o que reflete também a influência da adição deste tipo de corantes, na gama do violeta. Deve ser referido que as pequenas variações na tonalidade da cor detetadas também podem ter sido devidas às reações de Maillard. O resultado destas reações são o aspeto dourado do alimento quando tostado ou caramelizado. Esta reação ocorre entre os aminoácidos ou proteínas e os açúcares (carboidrato) quando o alimento é confeccionado; o grupo carbonilo ($C=O$) do carboidrato interage com o grupo amino ($-NH_2$) do aminoácido ou proteína, e após várias etapas produz as melanoidinas, que dão a cor e o aspeto característicos dos alimentos cozidos ou assados. (Wen-qiong, et al., 2013)

Em relação ao recheio (merengue italiano), verificou-se igualmente uma ligeira diminuição em L^* nos profiteroles aditivados, que por outro lado manifestaram um aumento significativo da intensidade da tonalidade vermelha (a^*). Em relação ao parâmetro b^* , a maior intensidade do amarelo foi notória entre os profiteroles controlo, provavelmente pela ausência de qualquer tipo de pigmento da gama do azul, contrariamente à situação verificada para PBS e PCC, cujos pigmentos presentes terão levado a um abaixamento do valor de b^* .

Tabela 8- Parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) medidos no exterior e no recheio das diferentes formulações de profiteroles.

	Aspetto exterior			Recheio		
	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*
PB	69±2 b	3,4±0,3 b	41±1 a	71±1 b	2,4±0,1 c	32±1 b
PBS	55±1 a	10±1 a	21±1 b	59±2 a	38±1 b	20±1 a
PCC	56±3 b	11±1 a	21±1 a	63±3 b	43±1 a	22±1 c
Homoscedasticidade ¹ (valor de p) (n = 27)	0,078	<0,001	0,858	<0,001	0,431	0,011
ANOVA ² (valor de p) (n = 27)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

¹Valores de p inferiores a 0,05 indicam distribuições heteroscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tamhane's T2; valores de p superiores a 0,05 indicam distribuições homoscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tukey HSD. ²Se o valor de p for inferior a 0,05, o parâmetro correspondente apresenta diferenças significativas para pelo menos um dos tipos de extrato (identificadas com letras diferentes).

3.1.3. Bioatividade das formulações de profiterole

Considerando a falta de citotoxicidade demonstrada pelo extrato de “bagaço” de sumo de sabugueiro (exceto no caso da linha celular HeLa, como indicado em 3.1.) e do corante comercial de cenoura, optou-se por não repetir esta avaliação nos profiteroles.

Por outro lado, era importante verificar se a significativa atividade antioxidante determinada nos dois tipos de corante adicionados se mantinha nos produtos alimentares preparados, o que constituiria uma característica vantajosa em relação aos seus eventuais efeitos sobre a saúde do consumidor.

A preparação das amostras foi feita como descrito em 2.4. Para além das formulações preparadas com corantes, a formulação PB também foi ensaiada, mas neste caso não foi possível calcular as EC_{50} de cada ensaio uma vez que até à máxima concentração ensaiada (25 mg/mL) não foi observada uma atividade superior a 50%. Em relação a PBS e a PCC, a atividade antioxidante observada foi ainda significativa, embora com valores de EC_{50} superiores ao do extrato de “bagaço” de sabugueiro, no caso de PBS, e do corante comercial de cenoura, no caso de PCC. Apesar de esta diminuição ser esperada, é possível que os extratos preparados a partir de cada tipo de profiterole apresentassem alguns contaminantes (*e.g.*, açúcares), o que poderá ter diminuído a sua concentração efetiva.

Tabela 9- Atividade antioxidante das diferentes formulações de profiteroles. Os resultados são apresentados como valores de EC₅₀, em mg/mL.

	Bloqueio de radicais DPPH	Poder redutor	Inibição da descoloração do β-caroteno
PB	>25	>25	>25
PBS	1,4±0,1	1,4±0,1	3,4±0,4
PCC	1,4±0,2	1,6±0,2	3,7±0,5
Homoscedasticidade ¹ (valor de <i>p</i>) (n = 18)	0,017	0,203	0,091
Teste de <i>t</i> -Student ² (valor de <i>p</i>) (n = 18)	0,759	0,089	0,357

¹Valores de *p* inferiores a 0,05 indicam distribuições heteroscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tamhane's T2; valores de *p* superiores a 0,05 indicam distribuições homoscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tukey HSD. ²Se o valor de *p* for inferior a 0,05, o parâmetro correspondente apresenta diferenças significativas para pelo menos um dos tipos de extrato (identificadas com letras diferentes).

3.1.4. Estabilidade dos agentes corantes

De forma a poder avaliar a estabilidade dos dois tipos de corantes utilizados, extrato de “bagaço” de sumo de sabugueiro e corante comercial de cenoura preta, amostras de PBS e PCC foram extraídas segundo o procedimento descrito em 2.6.

Tal como descrito em 3.1., a antocianina mais abundante nos extratos de “bagaço” de sumo de sabugueiro foi a cianidina-3-*O*-sambubiósido. Após a análise cromatográfica (descrita em 2.6.) de amostras diluídas (na mesma proporção em foram adicionadas aos PCC) do corante commercial de cenoura, verificou-se que a antocianina mais abundante neste caso era a feruloíl-cianidina-xilósido-glucósido-galactósido. Assim, foram quantificadas nos extratos de PBS e PCC, respetivamente as quantidades de cianidina-3-*O*-sambubiósido e de feruloíl-cianidina-xilósido-glucósido-galactósido. Em ambos os casos foi possível verificar que aproximadamente 60% da concentração em antocianinas incorporada em cada um dos casos foi mantida nas respetivas formulações de profiteroles. Embora fosse expectável alguma degradação térmica das antocianinas, é uma vez mais possível que os extratos pudessem conter alguns açúcares remanescentes dos profiteroles.

IV. Conclusão

Neste trabalho foi desenvolvida uma nova formulação de um produto alimentar bem conhecido, o profiterole. A grande inovação foi a introdução de um extrato rico em antocianinas, proveniente de bio-resíduos (“bagaço”) da extração de sumo de bagas de sabugueiro. Este extrato foi previamente caracterizado quanto à sua bioatividade e perfil em antocianinas, entre as quais a cianidina-3-*O*-sambubiósido foi a mais abundante.

Este produto foi caracterizado do ponto de vista nutricional, tendo-se verificado que os hidratos de carbono são os componentes mais abundantes ($\approx 60\%$), seguido pela gordura ($\approx 20\%$) e as proteínas ($\approx 10\%$). Em relação ao perfil em açúcares livres, apenas foi detetada a glucose, embora em quantidades muito baixas, e a sacarose. O perfil de ácidos gordos dos profiteroles mostrou uma relação de ácidos gordos totais: AGS>AGMI>AGPI, em que os maioritários foram o ácido palmítico e o ácido oleico (ambos com percentagens próximas de 30%).

A atividade antioxidante observada nos profiteroles incorporando extrato de “bagaço” de sabugueiro foi significativa, embora com valores de EC_{50} superiores aos daquele extrato: $1,4 \pm 0,1$ mg/mL (bloqueio DPPH e poder redutor), $3,4 \pm 0,4$ mg/mL (inibição da descoloração do β -caroteno) para os profiteroles, enquanto os valores conseguidos no extrato foram $0,22 \pm 0,02$ mg/mL (bloqueio de radicais DPPH), $0,39 \pm 0,03$ mg/mL (poder redutor) e $1,2 \pm 0,1$ mg/mL (inibição da descoloração do β -caroteno).

Tal como era objetivo, a adição do corante do extrato aquoso de “bagaço” de sabugueiro provocou uma alteração de cor significativa, o que reflete a influência da adição deste tipo de corantes, na gama do violeta, podendo manifestar-se visivelmente mais apelativo e inovador. De facto, o “bagaço” de sabugueiro manifesta um poder corante notável, tendo também uma apreciável atividade antioxidante. Assim, ao adicionar os compostos bioativos (antocianinas) responsáveis aos profiteroles, estes tornam-se simultaneamente um alimento funcional e mais apelativo.

Em relação às antocianinas, foi ainda verificada a sua estabilidade, tendo-se verificado que aproximadamente 60% da concentração inicial foi mantida nos profiteroles.

De um modo geral, foi possível desenvolver uma nova formulação para um produto amplamente aceite pelas suas características organoléticas, mas que não era considerado como o melhor exemplo de um alimento saudável.

Atendendo, à formulação desenvolvida neste trabalho, o profiterole está agora mais próximo de poder ser considerado um alimento funcional. Ao seu sabor tão bem aceite, foi adicionado potencial antioxidante pela incorporação de antocianinas bioativas obtidas a partir de bio-resíduos resultantes da extração do sumo de sabugueiro. Além do mais, estas antocianinas conferiram ao produto um aspeto inovador, que pode ser fundamental para a sua ainda melhor aceitação por parte dos consumidores, em especial porque as moléculas bioativas presentes no extrato incorporado são significativamente preservadas no processamento do mesmo.

V. Referências

- (EFSA), European Food Safety Authority. 2013.** Scientific Opinion on the re-evaluation of anthocyanins (E 163) as a food additive. *EFSA Journal*. 2013.
- Adeel, Shahid, et al. 2017.** Appraisal of marigold flower based lutein as natural colourant for textile dyeing under the influence of gamma radiations. *Radiation Physics and Chemistry*. 2017, Vol. 130, pp. 35-39.
- Almeida, Hanna Nóbrega. 2016.** Extração e purificação parcial de antocianinas do mirtilo com remoção simultânea dos açúcares redutores usando o sistema de duas fases aquosas etanol/sulfato de amônio. 2016.
- Arici, Muhammet, et al. 2015.** Tulip petal as a novel natural food colorant source: Extraction optimization and stability studies. *Industrial Crops and Products*. 2015, Vol. 91, pp. 215-222.
- Augusta, Ivanilda Maria. 2011.** Extração e secagem da casca de Jambo vermelho (*Syzygium malaccensis* (L.) MERRYL ET PERRY) para a obtenção de corante. 2011.
- Barrozo, M.A.S., Santos, K.G. and Cunha, F.G. 2013.** Mechanical extraction of natural dye extract from *Bixa orellana* seeds in spouted bed. *Industrial Crops and Products*. 2013, Vol. 45, pp. 279-282.
- Basho, Sirley Massako and Márcia Crestani, BIN. 2010.** Propriedades Dos Alimentos Funcionais e o Seu Papel na Prevenção e Controle da Hipertensão e Diabetes. *Interbio*. 2010, Vol. 4.
- Brito, Priscila Nunes. 2014.** Produção de ácido Gama-Poliglutâmico: estudo e otimização do processo utilizando resíduos agroindustriais. 2014.
- Candeias, Vanessa, et al. 2005.** Princípios para uma Alimentação Saudável. s.l. : Direção Geral da Saúde, 2005.
- Cardoso, Rossana Veviana Centeio. 2016.** Development of nutraceutical formulations based on mycelium of *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus*. 2016.
- Carocho, Márcio and Ferreira, Isabel C.F.R. 2012.** A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*. 2012, Vol. 51, pp. 15-25.

- Carochoa, Márcio, Morales, Patricia and Ferreira, Isabel C.F.R. 2015.** Natural food additives: Quo vadis? 2015.
- Chaves, Vitor Clasen. 2014.** Teor de antocianinas, compostos fenólicos e capacidade de captação de radicais livre de frutos de cultivares de morangueiro (Fragaria x ananassa Duch.). 2014.
- Chávez-Santoscoy, Rocio A., et al. 2016.** Production of maize tortillas and cookies from nixtamalized flour enriched with anthocyanins, flavonoids and saponins extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris*) seed coats. *Food Chemistry*. 2016, Vol. 192, pp. 90-97.
- Chávez-Santoscoy, Rocio A., et al. 2016.** Production of maize tortillas and cookies from nixtamalized flour enriched with anthocyanins, flavonoids and saponins extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris*) seed coats. *Food Chemistry*. 2016, Vol. 192, pp. 90-97.
- Chung, Cheryl, et al. 2016.** Enhancement of colour stability of anthocyanins in model beverages by gum arabic addition. *Food Chemistry*. 2016, Vol. 201, pp. 14-22.
- Concenço, Fernanda Izabel Garcia da Rocha, et al. 2015.** Desenvolvimento e avaliação da qualidade da polpa e extrato de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) em pó. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. 2015, Vol. 9, pp. 847-1859.
- Conselho, Parlamento Europeu e do. 2011.** Regulamento (UE) N.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho. *Jornal Oficial da União Europeia*. 2011, pp. 18-62.
- Cunha, A. Proença da. 2014.** *Farmacognosia e Fitoquímica*. s.l. : Fundação Calouste Gulbenkian, 2014.
- Davi, Edmar Henrique Dairell, et al. 2014.** Investigação prospectiva sobre o uso da mandioca e seus subprodutos no ramo das ciências médicas entre os anos 1969 a 2012. *Cadernos de Prospecção*. 2014, Vol. 7, pp. 97-106.
- Delgado, T., et al. 2014.** Shell's influence on drying kinetics, color and volumetric shrinkage of *Castanea sativa* Mill. fruits. *Food Research International*. 2014, Vol. 55, pp. 426-425.
- Dias, Maria Inês Moreira Figueiredo. 2011.** Caracterização química e molecular de amostras de *Coriandrum sativum* L. obtidas in vivo e in vitro. 2011.
- Duyms, Hale Gamze, Göger, Fatih and Bas, Hüsnü Can. 2014.** In vitro antioxidant properties and anthocyanin compositions of elderberry extracts. *Food Chemistry*. 2014, Vol. 155, pp. 112–119.

- EMA, European Medicines Agency. 2013.** Assessment report on Sambucus nigra L., fructus. 2013.
- Farias, Nadja Naiara Pereira, et al. 2014.** Farelo integral de arroz parboilizado submetido a armazenamento prolongado para alimentação de codornas de corte. *Agropec.* 2014, Vol. 49, pp. 407-475.
- Fernandes, Ana Luísa Mosqueira Alves Pires. 2014.** Interação de derivados de flavílios com carboidratos numa perspetiva alimentar. 2014.
- Ferreira, Isabel CFR and Abreu, Rui MV. 2007.** Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise.* 2007, Vol. 2, pp. 32-39.
- Freitas, Isabela Veronica. 2013.** Avaliação do consumo de corantes alimentares vermelhos por lactentes e crianças em idade pré-escolar. 2013.
- Gammella, Elena, Recalcati, Stefania and Cairo, Gaetano. 2016.** Dual Role of ROS as Signal and Stress Agents: Iron Tips the Balance in favor of Toxic Effects. *Hindawi Publishing Corporation.* 2016, Vol. 2016, pp. 1-9.
- Ge, Qin and Ma, Xiaojun. 2013.** Composition and antioxidant activity of anthocyanins isolated from Yunnan edible rose (An ning). *Food Science and Human Wellness.* 2013, Vol. 2, pp. 68-74.
- Giaretta, Andréia Gonçalves, et al. 2015.** Desenvolvimento da massa choux isenta da glúten. *Revista Técnico Científica do IFSC.* 2015.
- Gonçalves, Heloisa Morais. 2014.** Resíduo de uva Isabel (Vitis labrusca)- Encapsulação, Avaliação e Aplicação do Corante em Frozen Yogurt. 2014.
- Hamerski, L, Rezende, M.J.C. and B.V.Silva. 2013.** Usando as Cores da Natureza para Atender aos Desejos do Consumidor: Substâncias Naturais como Corantes na Indústria Alimentícia. *Revista Virtual de Química.* 2013, Vol. 5, pp. 394-420.
- Johann, Amanda and Gräff, Tânia Beatriz Acosta. 2014.** Preferência e aceitação de gelatinas, destinadas ao público infantil, fabricadas com corantes artificiais, naturais e extratos vegetais. *Revista de destaques académicos.* 2014, Vol. 6.
- Kaimainen, Mika, et al. 2015.** Consumer acceptance and stability of spray dried betanin in model juices. *Food Chemistry.* 2015, Vol. 187, pp. 398-406.

- Kamiloglu, Senem, et al. 2017.** Black carrot pomace as a source of polyphenols for enhancing the nutritional value of cake: An in vitro digestion study with a standardized static model. *LWT - Food Science and Technology*. 2017, Vol. 77, pp. 475-481.
- Karakaya, Sibel, et al. 2016.** Stability and bioaccessibility of anthocyanins in bakery products enriched with anthocyanins. *The Royal Society of Chemistry*. 2016, Vol. 7, pp. 3488-3496.
- Khan, Muhammad Issa, et al. 2013.** Tackling metabolic syndrome by functional foods. *Endocrine and Metabolic Disorders*. 2013, Vol. 14, pp. 287-297.
- Kinoshita, Emiko, et al. 2012.** Anti-Influenza Virus Effects of Elderberry Juice and Its Fractions. 2012, Vol. 76, pp. 1633-1638.
- Lopes, Toni Jefferson and Marcelo Fonseca Xavier, Mara Gabriela Novy Quadri, Marinho Bastos Quadri. 2007.** Antocianinas: Uma breve revisão das características. *Revista Brasileira Agrociência*. 2007, Vol. 13, pp. 291-297.
- Março, Paulo Henrique, Popp, Ronei Jesus and Scarminio, Ieda Spacino. 2008.** Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais . *Quimica Nova*. 2008, Vol. 31, pp. 1218-1223.
- Melo, F.V.S.T, et al. 2015.** Inclusão do bagaço de licuri na alimentação de codornas de corte na fase inicial e de crescimento. *Archivos de Zootecnia*. 2015, Vol. 65, pp. 513-518.
- Nestel, Paul, et al. 2015.** Indications for Omega-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid in the Prevention and Treatment of Cardiovascular Disease. *Heart, Lung and Circulation*. 2015, Vol. 24, pp. 769–779.
- Novello, Alexandre Azevedo. 2011.** Extração de antocianinas e a sua actuação como antioxidante e antiaterogénica. 2011.
- Oliveira, Ana, et al. 2015.** Incorporation of strawberries preparation in yoghurt: Impact on phytochemicals and milk proteins. *Food Chemistry*. 2015, Vol. 171, pp. 370-378.
- Oliveira, Daniela da Silva, et al. 2011.** Vitamina C, carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. *Acta Scientiarum. Health Sciences*. 2011, Vol. 33, pp. 89-98.
- Oroian, Mircea and Escriche, Isabel. 2015.** Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*. 2015, Vol. 74, pp. 10-36.

- Pereira, C., et al. 2011.** Nutritional composition and bioactive properties of commonly consumed wild greens: Potential sources for new trends in modern diets. *Food Research International*. 2011, Vol. 44, pp. 2634-2640.
- Pisoschi, Aurelia Magdalena and Pop, Aneta. 2015.** The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015, Vol. 97, pp. 55-74.
- Poprac, Patrik, et al. 2017.** Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2017, Vol. 38, pp. 592-607.
- Rani, Vibha, et al. 2016.** Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sciences*. 2016, Vol. 148, pp. 183-193.
- Rodrigues, Dina, et al. 2012.** Analytical strategies for characterization and validation of functional dairy foods. *Analytical Chemistry*. 2012, Vol. 41.
- Salvador, Ângelo C., Rocha, Sílvia M. and Silvestre, Armando J.D. 2015.** Lipophilic phytochemicals from elderberries (*Sambucus nigra* L.): Influence of ripening, cultivar and season. *Industrial Crops and Products*. 2015, Vol. 71, pp. 15-23.
- Sangeetha, K.S. Sridevi, et al. 2016.** Flavonoids: therapeutic potential of natural pharmacological agents. *International Journal Pharmaceutical Sciences and Research*. 2016, Vol. 7, pp. 2320-5148.
- Santos, Alessandro Carvalho Alves dos, et al. 2014.** Potencial antioxidante de antocianinas em fontes alimentares: revisão sistemática. *Revista Interdisciplinar*. 2014, Vol. 7, pp. 149-156.
- Santos, Daniela Colaço. 2016.** *Desenvolvimento de novos produtos – Frubaça*. Lisboa : s.n., 2016.
- Senica, Mateja, et al. 2016.** Processed elderberry (*Sambucus nigra* L.) products: A beneficial or harmful food alternative? *Food Science and Technology*. 2016, Vol. 72, pp. 182-188.
- Sharma, Pallavi, et al. 2012.** Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*. 2012.
- Shen, Yixiao, et al. 2014.** Simultaneous determination of red and yellow artificial food colourants and carotenoid pigments in food products. *Food Chemistry*. 2014, Vol. 157, pp. 553-558.

- Sidor, Andrzej and Gramza-Michałowska, Anna. 2015.** Advanced research on the antioxidant and health benefit of elderberry (*Sambucus nigra*) in food – a review. *Functional Foods*. 2015, Vol. 18, pp. 941–958.
- Silva, Pedro, Ferreira, Sandrine and Nunes, Fernando M. 2016.** Elderberry (*Sambucus nigra* L.) by-products a source of anthocyanins. *Industrial Crops and Products*. 2016, Vol. 95, pp. 227-234.
- Silva, Rafaela, et al. 2015.** Indicators as tools for analysis in processed food additives. *Gestão, Inovação e Tecnologias*. 2015, Vol. 5, pp. 2664-2677.
- Silva, Rodrigues da, et al. 2015.** Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. *Acta Toxicologica Argentina*. 2015, Vol. 23, pp. 36-43.
- Soares, Fernanda Santiago Chaves, et al. 2015.** Metabolitos Secundários Encontrados em Plantas e a sua Importância. 2015.
- Souza, Rosilane Moreth de. 2012.** Corantes naturais alimentícios e os seus benefícios à saúde. 2012.
- Sucupira, Natália Rocha, et al. 2012.** Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*. 2012.
- Sun-Waterhouse, Dongxiao, Zhou, Jing and Wadhwa, Sandhya S. 2013.** Drinking yoghurts with berry polyphenols added before and after fermentation. *Food Control*. 2013, Vol. 32, pp. 450-460.
- Teixeira, Ana Cristina Miguez and Oselame, Cristiane da Silva. 2013.** O Uso de Alimentos Funcionais No Cotidiano e os Seus Benefícios à Saúde. *Revista Científica do Colégio Militar de Curitiba*. 2013.
- Teixeira, Fernanda, et al. 2014.** Caracterização Nutricional e Reposta Sensorial De Pães De Mel Com Alto Teor De Fibra Alimentar Elaborados Com Farinhas De Subprodutos Do Proessamento De Frutas. *B.CEPPa*. 2014, Vol. 32.
- Teixeira, Joana, Feio, Marcelo and Figueira, Maria Luísa. 2014.** O Papel do Stress Oxidativo no Envelhecimento e na Demência. *Serviço de Psiquiatria do Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca*. Junho 2014, Vol. 12, pp. 43-57.
- Teixeira, Luciana Nascimento, Stringheta, Paulo César and Oliveira, Fabiano Alves de. 2008.** Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. 2008.

- Thole, Julie M., et al. 2005.** A Comparative Evaluation of the Anticancer Properties of European and American Elderberry Fruits. *Journal of Medicinal Food* . 2005, Vol. 9, pp. 498–504.
- Ulbricht, Catherine, et al. 2014.** An Evidence-Based Systematic Review of Elderberry and Elderflower (*Sambucus nigra*) by the Natural Standard Research Collaboration. *Journal of Dietary Supplements*. 2014, Vol. 11, pp. 80-120.
- Veberic, Robert, et al. 2009.** European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids,. *Food Chemistry*. 2009, Vol. 114, pp. 511–515.
- Viapiana, Agnieszka and Wesolowski, Marek. 2017.** The Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Infusions of *Sambucus nigra* L. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2017.
- Vichai, Vanicha and Kirtikara, Kanyawim. 2006.** Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Publishing Group*. 2006, Vol. 1, pp. 1114-1116.
- Vieira, Liliana do Céu Gomes. 2015.** Características fitoquímicas e propriedades antioxidantes do grão de café verde . 2015.
- Wen-qiong, Wang, Yi-hong, Bao and Ying, Chen. 2013.** Characteristics and antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products from interactions in a whey protein isolate and sugars system. *Food Chemistry*. 2013, Vol. 139, pp. 355-361.
- Wilson, Rose, et al. 2016.** *Growing Elderberries: A Production manual and enterprise viability guide for Vermont and the Northeast*. s.l. : UVM Center for Sustainable Agriculture, University of Vermont Extension, 2016.
- Wojtunik-Kulesza, Karolina A., et al. 2016.** The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer’s Disease. *ScienceDirect*. 2016, Vol. 78, pp. 39-49.
- Yates, Clara M., Calder, Philip C. and Rainger, G. Ed. 2014.** Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. *Pharmacology & Therapeutics*. 2014, Vol. 141, pp. 272–282.