

# **Desenvolvimento de um corante natural bioativo rico em antocianinas a partir de framboesa vermelha**

**Rosiane Yarine Duarte Lopes Rocha**

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e ao  
Instituto Politécnico da Guarda para obtenção do Grau de Mestre  
em Ciências Aplicadas à Saúde – Ramo Biotecnologia*

Orientada por:

Dr. José Pinela

Dra. Lillian Barros

Prof. Dr. António José Nogueira

*Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri.*

Bragança, novembro de 2020



Trabalho financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do Programa Operacional Regional Norte 2020, no âmbito do projeto Mobilizador Norte-01-0247-FEDER-024479: ValorNatural, também pelo programa FEDER-Interreg España-Portugal, através do projeto 0377\_Iberphenol\_6\_E, e pelo TRANSCoLAB 0612\_TRANS\_CO\_LAB\_2\_P. Um agradecimento à empresa “Ponto Agrícola Unipessoal, Lda” que gentilmente forneceu o material vegetal.





## AGRADECIMENTOS

Esta dissertação de mestrado é o resultado de muitas horas de trabalho e é importante exprimir os meus sinceros agradecimentos a algumas pessoas que me ajudaram na concretização desta etapa da minha vida.

Agradeço à minha família pelo amor e carinho, mesmo estando longe, apoiando-me incondicionalmente e acreditando em mim e nos meus objetivos. A vossa positividade deu-me forças para ultrapassar todo e qualquer obstáculo que surgiu durante a minha trajetória.

Um obrigado especial à minha querida mãe, que apesar de distante fisicamente, fez-se presente todos os dias transmitindo muito amor e apoio virtual através de palavras sabias e conversas longas de motivação e força para seguir sempre em frente. A ela dedico este trabalho, porque sem ela sei que não teria forças para chegar onde cheguei.

Não posso deixar de agradecer ao meu orientador Dr. José Pinela pelos ensinamentos, pela paciência, pela disponibilidade e por tudo que fez para que esta dissertação pudesse ser concluída. Obrigada também aos meus coorientadores: Prof. Dr. António José Nogueira e Dra. Lillian Barros, pela sugestão do tema e pelos aconselhamentos durante a elaboração da dissertação.

Agradeço a toda a equipa do CIMO que se prontificaram sempre a me ajudar durante todo o trabalho de laboratório, partilhando conhecimentos e orientando no que pudessem.

Muito obrigada a todos os meus amigos, principalmente às minhas “sis” por se mostrarem sempre dispostas a ajudar e apoiar em todos os momentos desta etapa e, por não me deixarem nunca desanimar e desistir.

Sou grata a todos os que, de uma forma ou de outra, contribuíram para que eu conseguisse alcançar mais essa conquista na minha vida.

Muitíssimo obrigada! 😊



## RESUMO

Atualmente, os corantes alimentares artificiais são alvo de grande controvérsia por parte do consumidor, da comunidade científica e do setor industrial. Estes aditivos, apesar de serem estáveis e baratos, têm sido associados a potenciais problemas de toxicidade, o qual tem vindo a dar preferência a alimentos formulados com corantes de base natural. Neste sentido, várias empresas têm vindo a comprometer-se a utilizar corantes naturais nos seus produtos alimentares para atender a este movimento que se tem intensificado. Contudo, ainda é necessário encontrar novas fontes de pigmentos naturais e otimizar processos de extração para uma recuperação eficiente e ecossustentável.

As antocianinas são moléculas muito promissoras para desenvolver este tipo de aditivos alimentares, pois permitem obter diferentes tonalidades de cor, além de proporcionarem efeitos bioativos de interesse para a conservação do alimento e para a saúde do consumidor. As antocianinas podem ser obtidas a partir de diferentes matrizes vegetais, entre as quais a framboesa vermelha (*Rubus idaeus* L.) é um bom exemplo e uma cultura em franco crescimento em Portugal. Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo geral de desenvolver um corante alimentar bioativo rico em antocianinas a partir de framboesa vermelha (mais concretamente bio-resíduos da sua produção).

Para isso, foram estudados e comparados dois métodos de extração assistidos por temperatura (EAT) e ultrassons (EAU) para extrair antocianinas a partir da framboesa vermelha. As variáveis independentes tempo de processamento, percentagem de etanol e temperatura ou potência ultrassónica foram combinadas em desenhos de composto central rotativo (DCCR) de cinco níveis e a metodologia de superfície de resposta (RSM) foi usada no processo de otimização. O rendimento de extração (massa de extrato) e os teores de cianidina-3-*O*-soforósido (C3S) e cianidina-3-*O*-glucósido (C3G) foram monitorizados por gravimetria e HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>, respetivamente, e usados como critérios de resposta na otimização.

Os modelos polinomiais construídos foram ajustados com sucesso aos dados experimentais e usados para determinar as condições ótimas de extração. Ao maximizar simultaneamente as variáveis dependentes, o método EAT originou valores de resposta ligeiramente superiores (61% de massa de extrato e 8,7 mg de antocianinas por grama de extrato), mas precisou de 76 min de processamento a 38 °C, usando 21% (v/v) de

etanol, enquanto o método EAU exigiu 16 min de sonicação a 466 W de potência, com 38% (v/v) de etanol.

Os modelos preditivos foram validados experimentalmente através da produção de extratos de framboesa vermelha nas condições ótimas de EAT e EAU e posterior comparação com os valores previstos pelos modelos matemáticos. Estes novos extratos ricos em antocianinas apresentaram uma cor vermelho-púrpura e atividade antioxidante *in vitro* pela capacidade de inibir a peroxidação lipídica (avaliada através do ensaio de inibição da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e de proteger da hemólise oxidativa provocada por radicais livres de relevância biológica. Esta maior atividade antioxidante foi atribuída ao extrato obtido pelo método EAT, o qual também apresentou o maior teor de antocianinas. Os extratos, quando testados pelo método de microdiluição em placa e pelo ensaio colorimétrico do cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT), também mostraram atividade antimicrobiana contra bactérias transmitidas por alimentos, como *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*.

Os resultados deste estudo destacaram o potencial dos extratos de framboesa como corantes alimentares naturais com efeitos bioativos e poderão ser explorados pelo setor industrial interessado na produção de ingredientes à base de antocianinas.

**Palavras-chave:** framboesa vermelha, corantes à base de cianidina, extração assistida por temperatura/ultrassom, otimização de processos, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

Currently, artificial food colours are the subject of great controversy by the consumer, the scientific community, and the industrial sector. These additives, despite being stable and inexpensive, have been associated with potential toxicity issues for the consumer, who has been giving preference to foods formulated with bio-based colorants. In this sense, several companies have been committed to using natural colorants in their food products to meet this movement that has intensified. However, it is still necessary to find new sources of natural pigments and optimize extraction processes for an efficient and eco-sustainable recovery.

Anthocyanins are very promising molecules for developing this type of food additives, as they allow different shades of colour to be obtained, in addition to providing bioactive effects of interest for food conservation and consumer health. Anthocyanins can be obtained from different plant matrices, among which the red raspberry (*Rubus idaeus* L.) is a good example and an emerging culture in Portugal. Therefore, this work was developed with the general objective of developing a bioactive anthocyanin-rich food colorant from red raspberry (more specifically bio-waste from its production).

For that, two extraction methods assisted by temperature (HAE) and ultrasounds (UAE) were studied and compared to extract anthocyanins from the red raspberry. The independent variables processing time, ethanol percentage, and temperature or ultrasonic power were combined in five-level rotatable central composite designs (RCCD) and the response surface methodology (RSM) was used in the optimization process. The extraction yield (extract weight) and levels of cyanidin-3-*O*-sophoroside (C3S) and cyanidin-3-*O*-glucoside (C3G) were monitored by gravimetry and HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>, respectively, and used as response criteria in the optimization.

The constructed polynomial models were successfully fitted to the experimental data and used to determine the optimal extraction conditions. When maximizing the dependent variables simultaneously, the HAE method gave slightly higher response values (61% extract weight and 8.7 mg anthocyanins per gram of extract), but it took 76 min of processing at 38 °C, using 21 % (v/v) of ethanol, while the UAE method required 16 min of sonication at 466 W, with 38% (v/v) of ethanol.

The predictive models were validated experimentally through the production of red raspberry extracts in the optimal conditions of HAE and UAE and later comparison with the values predicted by the mathematical models. These new extracts rich in anthocyanins showed a purple-red colour and antioxidant activity *in vitro* due to their ability to inhibit lipid peroxidation (evaluated through thiobarbituric acid reactive substances formation inhibition) and to protect from the oxidative haemolysis caused by biologically relevant free radicals. This greater antioxidant activity was attributed to the extract obtained by the HAE method, which also had the highest anthocyanin content. The extracts, when tested by the microdilution method and by the rapid *p*-iodonitrotetrazolium chloride (INT) colorimetric assay, also showed antimicrobial activity against food-borne bacteria, such as *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*.

The results of this study highlighted the potential of raspberry extracts as natural food colours with bioactive effects and could be explored by the industrial sector interested in the production of anthocyanin-based ingredients.

**Keywords:** red raspberry, cyanidin-based colorants, heat-/ultrasound-assisted extraction, process optimization, antioxidant activity, antimicrobial activity.

**ÍNDICE**

|  |           |
|--|-----------|
| AGRADECIMENTOS .....   | v         |
| RESUMO .....   | vii       |
| ABSTRACT .....   | ix        |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....  | xiii      |
| ÍNDICE DE TABELAS .....  | xv        |
| ABREVIATURAS .....   | xvii      |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO .....</b>                                | <b>6</b>  |
| 2.1. Aditivos alimentares .....                                      | 6         |
| 2.1.1. Importância dos aditivos alimentares .....                    | 6         |
| 2.1.2. Classes de aditivos alimentares .....                         | 7         |
| 2.1.3. Corantes alimentares naturais e artificiais .....             | 8         |
| 2.2. Antocianinas .....  | 10        |
| 2.2.1. Antocianinas como corantes naturais .....                     | 10        |
| 2.2.2. Antocianinas como compostos bioativos .....                   | 11        |
| 2.2.3. A framboesa vermelha como fonte de antocianinas .....         | 12        |
| 2.3. Métodos para obtenção de extratos ricos em antocianinas .....   | 14        |
| 2.4. Aplicação de antocianinas em produtos alimentares .....         | 16        |
| <b>3. OBJETIVOS .....</b>  | <b>20</b> |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                   | <b>24</b> |
| 4.1. Padrões e reagentes .....                                       | 24        |
| 4.2. Material vegetal .....  | 24        |
| 4.3. Medições dos parâmetros de cor .....                            | 24        |
| 4.4. Desenho experimental para os processos de extração .....        | 25        |
| 4.5. Métodos de extração .....                                       | 26        |
| 4.6. Determinação do rendimento de extração .....                    | 27        |
| 4.7. Análise cromatográfica de antocianinas .....                    | 27        |
| 4.8. Modelação dos processos de extração e análise estatística ..... | 28        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.9. Validação experimental dos modelos e avaliação do potencial corante e bioativo dos extratos produzidos em condições otimizadas ..... | 29        |
| 4.9.1. Potencial corante.....   | 29        |
| 4.9.2. Capacidade de inibição da peroxidação lipídica.....  | 29        |
| 4.9.3. Atividade anti-hemolítica .....  | 30        |
| 4.9.4. Atividade antibacteriana .....   | 31        |
| 4.9.5. Análise estatística .....  | 32        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>  | <b>36</b> |
| 5.1. Perfil antociânico da framboesa vermelha e resultados experimentais para a otimização dos processos de extração.....                 | 36        |
| 5.2. Ajuste e verificação estatística dos modelos.....  | 39        |
| 5.3. Efeito dos parâmetros de extração no conteúdo de antocianina .....   | 42        |
| 5.3.1. Extração assistida por temperatura .....   | 42        |
| 5.3.2. Extração assistida por ultrassons .....  | 45        |
| 5.3.3. Processamento por EAT versus EAU.....  | 48        |
| 5.4. Validação experimental dos modelos .....   | 51        |
| 5.5. Propriedades corantes e bioativas dos extratos .....   | 52        |
| <b>6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS .....</b>  | <b>58</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>   | <b>59</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 1.</b> Estrutura química da tartrazina e do amarelo de quinoleína .....  | <b>10</b> |
| <b>Figura 2.</b> Estrutura química básica das antocianidinas, agliconas das antocianinas. ....   | <b>11</b> |
| <b>Figura 3.</b> Gráfico da produção e área de cultivo de framboesa em Portugal.....   | <b>13</b> |
| <b>Figura 4.</b> Estrutura química da cianidina-3-O-soforósido e da cianidina-3-O-glucósido encontradas na framboesa vermelha .....  | <b>14</b> |
| <b>Figura 5.</b> Equipamento ultrassónico utilizado em processos de extração. ....   | <b>16</b> |
| <b>Figura 6.</b> Representação dos vinte pontos experimentais no espaço experimental, incluindo oito pontos fatoriais, seis pontos axiais ou estrela e seis pontos centrais .....  | <b>26</b> |
| <b>Figura 7.</b> Gráficos de superfície de resposta para os efeitos do tempo de extração ( <i>t</i> ), temperatura ( <i>T</i> ) e proporção de etanol ( <i>S</i> ) no rendimento de extração (% <i>m/m</i> ) e teores de cianidina-3- <i>O</i> -soforósido (C3S), cianidina-3- <i>O</i> -glucósido (C3G) e totais de antocianinas (C3S + C3G) (mg/g extrato) obtidos a partir de framboesa vermelha pelo processo EAT. ....          | <b>43</b> |
| <b>Figura 8.</b> Gráficos de superfície de resposta para os efeitos do tempo de extração ( <i>t</i> ), potência ultrassónica ( <i>P</i> ) e proporção de etanol ( <i>S</i> ) no rendimento de extração (% <i>m/m</i> ) e teores de cianidina-3- <i>O</i> -soforósido (C3S), cianidina-3- <i>O</i> -glucósido (C3G) e totais de antocianinas (C3S + C3G) (mg/g extrato) obtidos a partir de framboesa vermelha pelo processo EAU..... | <b>47</b> |
| <b>Figura 9.</b> Gráficos de resposta 2D para os efeitos das variáveis independentes no rendimento de extração (% <i>m/m</i> ) e teor de antocianinas totais (mg/g de extrato) obtidos a partir da framboesa vermelha por EAT e EAU ao maximizar simultaneamente todas as respostas. Em cada gráfico, as variáveis excluídas foram posicionadas no seu valor ótimo global (Tabelas 5 e 6). ....                                      | <b>50</b> |



## ÍNDICE DE TABELAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabela 1.</b> Valores codificados e naturais das variáveis independentes usadas nos processos de extração assistidos por temperatura (EAT) e ultrassons (EAU)  | <b>25</b> |
| <b>Tabela 2.</b> Antocianinas identificadas no extrato de framboesa vermelha. É apresentado o tempo de retenção (Tr), o comprimento de onda de absorção máxima na região UV-vis ( $\lambda_{\max}$ ), o íão pseudomolecular e os fragmentos MS <sup>2</sup> (abundância relativa entre parêntesis). .....   | <b>37</b> |
| <b>Tabela 3.</b> Respostas experimentais obtidas nas condições de extração definidas pelo desenho DCCR para o rendimento de extração (% , <i>m/m</i> ) e teores de cianidina-3- <i>O</i> -soforósido (C3S, mg/g extrato), cianidina-3- <i>O</i> -glucósido (C3G, mg/g extrato) e de ambas as antocianinas (total, mg/g extrato) em função do método de extração. Os valores naturais das variáveis independentes são apresentados na Tabela 1 | <b>38</b> |
| <b>Tabela 4.</b> Valores paramétricos da equação polinomial para os critérios de resposta e informações estatísticas do procedimento de ajuste dos modelos para ambos os processos de extração. Os parâmetros sobrescritos 1, 2 e 3 representam as variáveis: tempo, temperatura ou potência e solvente, respetivamente .....   | <b>40</b> |
| <b>Tabela 5.</b> Condições ótimas de processamento que maximizam a extração EAT de antocianinas a partir de framboesa vermelha e respostas previstas pelo modelo e obtidas experimentalmente.....   | <b>44</b> |
| <b>Tabela 6.</b> Condições ótimas de processamento que maximizam a extração EAU de antocianinas a partir de framboesa vermelha e respostas previstas pelo modelo e obtidas experimentalmente.....   | <b>46</b> |
| <b>Tabela 7.</b> Parâmetros de cor do pó liofilizado de framboesa vermelha e dos extratos obtidos nas condições otimizadas de EAT e EAU.....  | <b>52</b> |
| <b>Tabela 8.</b> Atividade antioxidante dos extratos de framboesa vermelha obtidos nas condições otimizadas de EAT e EAU e do controlo positivo.....  | <b>53</b> |
| <b>Tabela 9.</b> Atividade antibacteriana dos extratos de framboesa vermelha obtidos nas condições ótimas de EAT e EAU e dos controlos positivos.....   | <b>56</b> |



## ABREVIATURAS

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| Cromaticidade do verde (-) ao vermelho (+)  | <b><i>a</i>*</b>              |
| Dicloridrato de 2,2'-Azobis (2 metilpropionamidina)   | <b>AAPH</b>                   |
| Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)  | <b>ABTS</b>                   |
| Cromaticidade do azul (-) ao amarelo (+)  | <b><i>b</i>*</b>              |
| Interceção  | <b><i>b</i><sub>0</sub></b>   |
| Coefficiente de efeito linear   | <b><i>b</i><sub>i</sub></b>   |
| Coefficiente de efeito quadrático   | <b><i>b</i><sub>ii</sub></b>  |
| Coefficiente de efeito interativo   | <b><i>b</i><sub>ij</sub></b>  |
| Coefficiente de efeito cúbico   | <b><i>b</i><sub>iii</sub></b> |
| Concentração mínima bactericida, do inglês <i>minimum bactericidal concentration</i>                                  | <b>MBC</b>                    |
| Concentração mínima inibitória, do inglês <i>minimum inhibitory concentration</i>                                     | <b>MIC</b>                    |
| Cianidina-3- <i>O</i> -glucósido  | <b>C3G</b>                    |
| Cianidina-3- <i>O</i> -soforósido   | <b>C3S</b>                    |
| Coefficiente de variação  | <b>C.V.</b>                   |
| Detetor de arranjo de díodos  | <b>DAD</b>                    |
| Desenho de composto central rotativo  | <b>DCCR</b>                   |
| 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo   | <b>DPPH</b>                   |
| Extração assistida por temperatura  | <b>EAT</b>                    |
| Extração assistida por ultrassons   | <b>EAU</b>                    |
| Concentração de extrato com 50% de efeito antioxidante  | <b>EC<sub>50</sub></b>        |
| Fonte de ionização por electrospray, do inglês <i>electrospray ionization</i>   | <b>ESI</b>                    |
| Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estado Unidos da América, do inglês <i>Food and Drug Administration</i> | <b>FDA</b>                    |
| Poder antioxidante redutor férrico  | <b>FRAP</b>                   |
| Concentração que inibe 50% do crescimento celular   | <b>GI<sub>50</sub></b>        |
| Geralmente reconhecido como seguro, do inglês <i>generally recognized as safe</i>                                     | <b>GRAS</b>                   |
| Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>high-performance liquid chromatography</i>                     | <b>HPLC</b>                   |

|  |   |
|--|---|
| Cloreto de <i>p</i> -iodonitrotetrazólio   | <b>INT</b>                                |
| Luminosidade, do preto (0) ao branco (100)   | <b><i>L</i>*</b>                          |
| Razão massa/carga  | <b><i>m/z</i></b>                         |
| Malondialdeído Ágar  | <b>MDA</b>                                |
| Mueller-Hinton   | <b>MH</b>                                 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina   | <b>MRSA</b>                               |
| Espetroscopia de massa, do inglês <i>mass spectrometry</i>                                       | <b>MS</b>                                 |
| Metodologia de superfície de resposta, do inglês <i>response surface methodology</i>             | <b>RSM</b>                                |
| Não significativo  | <b><i>ns</i></b>                          |
| Ensaio da inibição da hemólise oxidativa, do inglês <i>oxidative haemolysis inhibition assay</i> | <b>OxHLIA</b>                             |
| Potência ultrassônica  | <b><i>P</i></b>                           |
| Solução salina tamponada com fosfato   | <b>PBS</b>                                |
| Coefficiente de determinação   | <b><i>R</i><sup>2</sup></b>               |
| Coefficiente de determinação ajustado  | <b><i>R</i><sup>2</sup><sub>adj</sub></b> |
| Vermelho-verde-azul, do inglês <i>red-green-blue</i>   | <b>RGB</b>                                |
| Solvente de extração   | <b><i>S</i></b>                           |
| Temperatura  | <b><i>T</i></b>                           |
| Tempo  | <b><i>t</i></b>                           |
| Ácido tiobarbitúrico   | <b>TBA</b>                                |
| Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico   | <b>TBARS</b>                              |
| Caldo de soja trípico  | <b>TSB</b>                                |
| União Europeia   | <b>UE</b>                                 |
| Ultravioleta-Visível   | <b>UV-Vis</b>                             |
| Rendimento de extração   | <b><math>\eta</math></b>                  |
| Intervalo de tempo   | <b><math>\Delta t</math></b>              |
| Ião pseudomolecular  | <b>[MH]<sup>+</sup></b>                   |





## 1. INTRODUÇÃO

Os corantes alimentares são amplamente utilizados na indústria alimentar com o objetivo de melhorar as características sensoriais dos alimentos e para reter ou proporcionar a cor pretendida (Martins et al., 2016). Nos últimos anos, o consumo de alimentos formulados com corantes artificiais tornou-se bastante controverso devido aos potenciais efeitos adversos que estas moléculas podem ter na saúde do consumidor. Nesse sentido, foram várias as companhias por todo o mundo que se comprometeram a substituir estes aditivos (sintetizados ou modificados quimicamente após extração) por alternativas naturais, a fim de atender às expectativas do consumidor por alimentos naturais, seguros e saudáveis (Chapman, 2011; Martins et al., 2016). No entanto, o uso de corantes naturais tem sido limitado no setor industrial, em parte devido à disponibilidade limitada de opções (Chapman, 2011), embora ainda existam muitas potenciais fontes naturais inexploradas.

As antocianinas, os carotenoides, as betalainas e os compostos fenólicos são corantes alimentares de ocorrência natural. Também já foram estudados o anato, o ácido carmínico e alguns curcuminoides, enquanto outros corantes ainda precisam de ser estudados e avaliados para serem autorizados com um código “E” (Carocho et al., 2015). Entre estas moléculas, as antocianinas apresentam cores atrativas que variam do vermelho ao roxo e constituem um importante grupo de pigmentos hidrossolúveis que podem ser usados como corantes alimentares (Belwal et al., 2020; EFSA, 2013). Além do poder corante, as antocianinas apresentam efeitos benéficos para a saúde humana, estando envolvidas na prevenção de doenças cardiovasculares e no controle da obesidade, podendo também ser utilizadas como aditivos funcionais (Albuquerque et al., 2020; He and Giusti, 2010; Norberto et al., 2013). Estes pigmentos são abundantemente encontrados em frutos vermelhos, entre os quais a framboesa vermelha, que surge como uma fonte notável de cianidina 3-*O*-glucósido e cianidina 3-*O*-soforósido, entre outras antocianinas (Anjos et al., 2020; Beekwilder et al., 2005; Krauze-Baranowska et al., 2014; Norberto et al., 2013; Sariburun et al., 2010) e poderá ser promissor usar extratos antociânicos de framboesa como corantes bioativos naturais.

Tal como acontece com outras biomoléculas, a extração de antocianinas a partir de matrizes vegetais segue geralmente um processo de recuperação ou uma abordagem holística de cinco etapas que vai desde o pré-tratamento da amostra até a formulação do produto final de base natural, onde o processo de extração é uma etapa crucial

(Galanakis, 2012). Entre as técnicas de extração existentes, os métodos sólido-líquido convencionais como a maceração, a extração por Soxhlet e a extração assistida por calor ou temperatura (EAT), estão geralmente associados a um elevado consumo de solvente ou a tempos de processamento longos que podem afetar a integridade e/ou a bioatividade dos compostos ou fazer com que estas metodologias fiquem mais caras (Chávez-González et al., 2020). Por outro lado, têm sido testados métodos não convencionais, como a extração assistida por ultrassons (EAU) e micro-ondas (EAM) e extrações promovidas por eletrotecnologias e alta pressão, na tentativa de encontrar processos eficientes que aumentem o rendimento de extração de compostos intracelulares (Backes et al., 2018; Corrales et al., 2008; Pinela et al., 2019). A EAU é um método utilizado à escala laboratorial e industrial; os efeitos de cavitação promovidos pelos ultrassons promovem a rutura da parede das células vegetais e a redução do tamanho da partículas que promove interações solvente-soluto (Wu et al., 2019). No entanto, a energia aplicada para promover o rebentamento das células vegetais também pode afetar os compostos alvo se aplicada em excesso, bem como os demais fatores usados no processo de extração. Portanto, os fatores ou variáveis independentes mais relevantes devem ser combinadas em desenhos experimentais acoplados a uma ferramenta de otimização apropriada, como a metodologia de superfície de resposta (RSM). Ao contrário das abordagens *one-factor-at-a-time*, a metodologia RSM descreve a relação entre variáveis independentes e uma ou mais respostas e permite avaliar interações e otimizar processos com um baixo número de ensaios experimentais.

Apesar do número crescente de estudos sobre extração de antocianinas a partir de matrizes vegetais, tais como framboesa (Chen et al., 2007; Sun et al., 2007), medronho (*Arbutus unedo* L.) (López et al., 2018), epicarpo de maracujá (*Passiflora edulis* Sims) (Ghada et al., 2020), epicarpo de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg.) (Albuquerque et al., 2020) e casca de figo (*Ficus carica* L.) (Backes et al., 2018), a produção e comercialização industrial de tais produtos permanecem insuficientes (Corrado e Sala, 2018; European Commission, 2019). Assim, a otimização e comparação de técnicas de extração convencionais (EAT) e inovadoras (EAU) pode ser vista como uma abordagem promissora e uma opção para a conversão da framboesa em corantes naturais.

Este estudo foi realizado com o objetivo de desenvolver extratos antociânicos de framboesa vermelha para serem utilizados como corantes alimentares naturais. Numa

primeira fase, pretende-se otimizar os processos de extração EAT e EAU por combinação de três fatores em desenhos experimentais de 5 níveis acoplados a RSM. Posteriormente, após determinar as condições ótimas de processamento, objetiva-se também a avaliação do potencial corante e das atividades antioxidante e antimicrobiana dos extratos obtidos nessas condições, a fim de garantir o seu potencial como ingrediente alimentar.



## 2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

### 2.1. Aditivos alimentares

#### 2.1.1. Importância dos aditivos alimentares

Os aditivos alimentares são substâncias adicionadas intencionalmente aos alimentos com o objetivo de conservar ou modificar características organolépticas, manter ou melhorar a sua estabilidade ou torná-los mais apetecíveis para o consumidor (Carocho et al., 2014). O avanço tecnológico e o surgimento de alimentos industrializados cada vez mais processados tem promovido o uso alargado de vários tipos de aditivos. Simultaneamente, o consumidor está cada vez mais cauteloso com questões de segurança alimentar e, dos vários itens relacionados com esta questão, os aditivos alimentares artificiais estão entre os mais controversos e os que têm despertado maiores preocupações ao consumidor e à indústria (Barrett, 2007; Boutillier et al., 2020; Kumar et al., 2019). Neste sentido, considerando os regulamentos impostos pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América (FDA) e pela Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (EFSA), o uso de aditivos alimentares tem vindo a tornar-se mais restritivo e controlado (Carocho et al., 2014).

A monitorização da utilização de aditivos em alimentos é feita por um comité conjunto de especialistas da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre aditivos alimentares (JECFA) (FAO/WHO, 2016). Este organismo recomenda que todos os países verifiquem o nível de consumo total de cada aditivo específico de forma a assegurar que a sua ingestão não ultrapasse a dose diária admissível (DDA) (JECFA, 2019). Quando se pretende introduzir no mercado um novo aditivo, a FDA e a EFSA são as entidades responsáveis pela realização de ensaios de toxicidade (Carocho et al., 2014; Chappell et al., 2020). Durante este processo, são considerados vários critérios para avaliar a segurança do aditivo, tais como a composição e propriedades inerentes à substância, a quantidade habitualmente utilizada e os efeitos imediatos e a longo prazo. Quando o aditivo é reconhecido como seguro, este adquire a designação GRAS (geralmente reconhecido como seguro) (Kumar et al., 2019). No entanto, todos os aditivos alimentares devem ser mantidos sob vigilância permanente e avaliados sempre que necessário.

Na União Europeia (UE), os aditivos alimentares são classificados de acordo com o sistema de numeração internacional definido pela Comissão do *Codex*

*Alimentarius*. Este sistema tem facilitado a implementação e monitorização da regulamentação e garantido uma informação mais acessível ao consumidor (FAO/WHO, 2020). A nomenclatura adotada inclui a letra “E” como prefixo, que representa a Europa, seguida de 3 algarismos que identificam o aditivo. Por exemplo, E1 representa a classe dos corantes, E2 conservantes, E3 antioxidantes, E4 agentes de textura, E6 intensificadores de sabor e E9 adoçantes (Carocho et al., 2014; Martins et al., 2016). Em países não pertencentes à UE, a classificação em vigor implica a mesma numeração, porém sem a denominação “E” em prefixo (FDA, 2019).

Em Portugal, a lista de aditivos e as condições de utilização permitidas encontram-se no Regulamento (UE) N.º 1129/2011 da Comissão, o qual também abrange os códigos correspondentes a cada aditivo alimentar.

### ***2.1.2. Classes de aditivos alimentares***

De acordo com o Regulamento (CE) N.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2008, os aditivos alimentares são agrupados em cerca de 26 classes de acordo com as suas funções. A FDA, por sua vez, reduz este número para seis classes, incluindo corantes, conservantes, intensificadores de sabor, agentes de textura, aditivos com valor nutricional e outros agentes (Blekas, 2015; Carocho et al., 2014). Os corantes são usados para alterar ou conferir uma determinada cor ao alimento, de modo a melhorar as suas características organolépticas e a torná-lo mais recetivo por parte do consumidor (Martins et al., 2016; Rodriguez-Amaya, 2016). Na classe dos conservantes destacam-se os antimicrobianos e os antioxidantes. Estes são geralmente usados para inibir a deterioração e aumentar o tempo de prateleira do alimento e/ou para controlar a contaminação microbológica (Blekas, 2015; Carocho et al., 2014). Já os aditivos com valor nutricional visam fornecer ou enriquecer o valor nutritivo dos géneros alimentícios. Embora esta classe não se encontre descrita pelo sistema de numeração “E”, alguns destes aditivos estão incluídos noutras classes dada a sua ampla variedade de aplicações, tais como as vitaminas C e E, muito utilizadas para acrescentar valor nutricional aos alimentos mas também pelo efeito antioxidante, útil para ajudar a prevenir reação de degradação (Carocho et al., 2014).

Relativamente aos intensificadores de sabor, estes têm como finalidade melhorar ou alterar integralmente o sabor de um produto alimentar. Estes podem ser divididos em adoçantes e promotores de sabor (Blekas, 2015; Carocho et al., 2017). Por sua vez, os

agentes de textura atuam sobre a consistência do alimento e podem ser diferenciados em emulsionantes, estabilizantes, espessantes e gelificantes. Os emulsionantes têm como principal função manter a integridade e a dispersão de uma emulsão no alimento e, por isso, são moléculas que apresentam um grupo hidrofílico e um grupo hidrofóbico. Abrangem compostos de origem natural, como a lecitina e os glicéridos, bem como substâncias sintéticas (Carocho et al., 2014). Os estabilizantes, por sua vez, são amplamente utilizados em produtos com uma consistência instável perante agentes externos, como por exemplo em gelados (Blekas, 2015).

Certos aditivos não se incluem em nenhuma das classes referidas, tais como os agentes quelantes, anti-espuma, lubrificantes e enzimas. Estes “outros agentes” são adicionados aos alimentos com um propósito específico, mas não reúnem critérios que permitem a inclusão nos outros grupos (Blekas, 2015).

### ***2.1.3. Corantes alimentares naturais e artificiais***

A cor e a aparência são os primeiros atributos percebidos durante o processo de degustação e aceitação dos alimentos por parte do consumidor, o qual faz um pré-julgamento e cria uma expectativa acerca das características organolépticas e de qualidade (Martins et al., 2017). A cor é prontamente associada ao sabor do produto (e.g., os alimentos vermelhos são geralmente associados ao sabor do morango), sendo poucos os casos em que esta não remeta ao seu sabor (Huang et al., 2019). É por isso que a questão da cor dos alimentos é levada tão a sério pelos consumidores e pela indústria alimentar.

Da produção à conservação de alimentos, há uma necessidade de que os produtos industrializados ou processados apresentem uma cor idêntica à dos produtos originais. A tonalidade de cor é proporcionada pela presença natural de pigmentos, pela formação de substâncias corantes como produto de reações químicas ou enzimáticas e pela adição intencional de corantes, entre outros fatores. Estes são adicionados aos alimentos nos casos em que se pretende recuperar a sua cor original alterada durante o processamento, proporcionar um aspeto atraente, proteger constituintes sensíveis à luz e/ou conservar a cor característica do produto original (Martins et al., 2016).

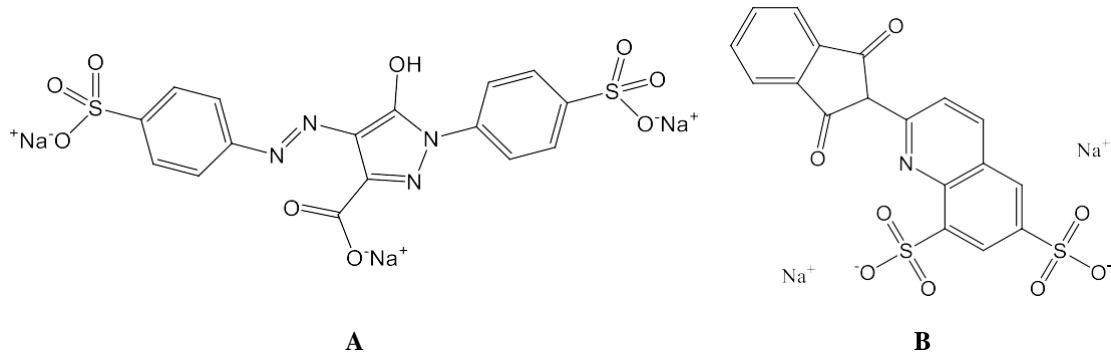
Os corantes podem ser obtidos a partir de fontes naturais (plantas, animais ou minerais) ou através de síntese química (Carocho et al., 2014). Em 1865, o químico inglês Perkin sintetizou o primeiro corante orgânico de importância comercial que foi designado de púrpura de anilina ou púrpura de Tiro. Esta descoberta permitiu

incrementar a investigação em corantes artificiais, impulsionando, algum tempo depois, a síntese de vários outros compostos químicos com capacidade corante (Corradini, 2018). Os corantes artificiais podem conferir aos produtos onde são introduzidos uma ampla gama de cores, cobrindo praticamente todas as tonalidades do espectro visível. Além disso, o baixo custo de produção, a elevada estabilidade, o elevado poder corante e a uniformidade da cor proporcionada pelos corantes artificiais são algumas das vantagens comparativamente aos análogos naturais (Corradini, 2018). Contudo, estas vantagens são acompanhadas de problemas que resultam de um estudo contínuo e aprofundado dos seus efeitos adversos à saúde do consumidor (Boutillier et al., 2020; Kumar et al., 2019).

A toxicidade potencial apresentada pelos corantes artificiais é o seu principal inconveniente, o que os torna numa espécie de aditivo indesejável pelo consumidor. Um dos fatores mais preocupantes sobre as questões de segurança dos corantes artificiais é que, de facto, a maioria dos produtos alimentares formulados com estas moléculas é consumida diariamente (Martins et al., 2016). Vários estudos sugerem que o consumo excessivo de alimentos com corantes artificiais pode provocar diversas alterações clínicas: reações de hipersensibilidade, dermatites, eczema, prurido, diarreia, náuseas, vômitos, anafilaxia, asma e até mesmo processos tumorais (Amchova et al., 2015). Além destes sintomas, os corantes artificiais já foram descritos como sendo responsáveis por causar alterações comportamentais em crianças, tais como o transtorno de deficit de atenção/hiperatividade (TDA/TDAH). Atualmente, 6 corantes artificiais estão associados a esta perturbação, tais como a tartarazina (E102) (**Figura 1A**), o amarelo de quinoleína (E104) (**Figura 1B**), o amarelo-sol FCF (E110) e o vermelho allura AC (E129), ponceau 4R (E124) e azorubina ou carmosina (E122) (Martins et al., 2016). O TDA/TDAH em crianças de 3 a 9 anos de idade foi já associado à ingestão de alimentos com corantes artificiais e derivados do benzoato de sódio, o que destaca a gravidade dos perigos associados à ingestão destas moléculas artificiais (Barrett, 2007).

A indústria alimentar tem dado preferência aos corantes artificiais por serem mais económicos e brilhantes, pela capacidade de conferirem uma cor mais intensa e por serem mais estáveis do que os naturais. No entanto, o maior conhecimento e consciencialização do consumidor tem levado a que este comece a dar preferência a produtos formulados com corantes naturais, os quais são cada vez mais apontados como uma alternativa face aos corantes artificiais. As cores naturais podem ser obtidas a partir de uma vasta variedade de matrizes naturais (Martins et al., 2016; Rodriguez-Amaya,

2016). Apesar do uso de alternativas naturais poder elevar o custo final do produto alimentar, este poderá ser considerado mais seguro e saudável. Contudo, durante o processo de extração, os pigmentos naturais podem sofrer fenómenos de oxidação. Por outro lado, como são menos intensos, poderá ser necessário utilizar uma maior quantidade para obter a cor desejada, o que pode comprometer as características organoléticas do alimento e, conseqüentemente, a sua aceitação pelo consumidor.



**Figura 1.** Estrutura química da tartrazina (A) e do amarelo de quinoleína (A).

Também é importante referir que é necessário realizar mais estudos clínicos a fim de elucidar os efeitos toxicológicos inerentes à ingestão não só de um único corante artificial, mas também de misturas de corantes, pois esta é uma situação muito frequente no dia-a-dia do consumidor (Amchova et al., 2015).

## 2.2. Antocianinas

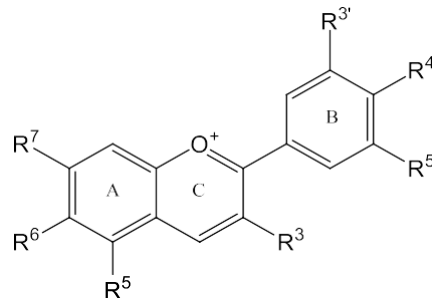
### 2.2.1. Antocianinas como corantes naturais

Os pigmentos naturais podem ser divididos em antocianinas, betalaínas, clorofilas e carotenoides, entre outros. Estes podem ser obtidos a partir de várias matrizes naturais e ser usados diretamente como corantes ou após modificação química para aumentar a sua estabilidade, tendo a capacidade de conferir diferentes cores, incluindo verde, amarelo, laranja, vermelho, azul e violeta (Rodriguez-Amaya, 2016; Sigurdson et al., 2017).

As antocianinas são pigmentos solúveis em água responsáveis pela cor de flores (Belwal et al., 2020; Pinela et al., 2019), frutos (Albuquerque et al., 2020; Backes et al., 2018; López et al., 2018) e outros tecidos vegetais (Mojica et al., 2017). Estes protegem os tecidos vegetais contra tensões bióticas e abióticas, retardam a senescência e o amadurecimento, auxiliam na maquinaria fotossintética e eliminam espécies reativas (Moustaka et al., 2020). Além de proporcionarem benefícios à saúde do consumidor, as

antocianinas são responsáveis pela cor avermelhada, azul ou arroxeadada dos frutos vermelhos (Anjos et al., 2020).

Existem cerca de 300 antocianinas na natureza. A sua estrutura química deriva de glicosídeos do catião flavílio com diferentes graus de hidroxilação e metoxilação. Na sua forma não glicosilada denominam-se de antocianidinas (agliconas) (**Figura 2**) (Khoo et al., 2017). A diversidade estrutural das antocianidinas depende do número e posição dos grupos hidroxilo e metoxilo ligados aos anéis aromáticos (A e B). Estas substituições afetam a cor de cada uma das antocianidinas, o que condiciona a sua aplicação como corantes na indústria alimentar (Khoo et al., 2017). Enquanto a hidroxilação origina uma tonalidade azul, a metoxilação proporciona uma tonalidade vermelha. Por outro lado, as antocianinas metoxiladas são mais estáveis que as hidroxiladas, uma vez que as moléculas *orto*-hidroxiladas são mais facilmente transformadas em quinonas. A um determinado pH, as antocianinas-3-glucósido são mais coradas que as antocianinas-3,5-diglucósido. Da mesma forma, as antocianinas podem ser coradas ou não, consoante o pH do meio, a sua concentração e a presença ou não de copigmentos (Belwal et al., 2020).



**Figura 2.** Estrutura química básica das antocianidinas, agliconas das antocianinas.

A interação das antocianinas com outros compostos pode afetar a sua estabilidade e contribui para a enorme variedade de cores que estas podem exibir. Este fenómeno é conhecido por copigmentação e deve-se à ocorrência de interações moleculares entre a antocianina e um copigmento (e.g., flavonoides) que permitem intensificar a intensidade da cor (Belwal et al., 2020).

### ***2.2.2. Antocianinas como compostos bioativos***

Os frutos silvestres contêm uma quantidade elevada de vários compostos bioativos que, individualmente ou em combinação, podem ter um efeito positivo na saúde humana.

Estes são conhecidos por serem uma fonte rica em antioxidantes, tais como as antocianinas. Estes compostos bioativos têm sido descritos como promotores de saúde, estando envolvidos na proteção contra doenças cardiovasculares e coronárias e como sendo benéficos sobre a função ocular e o processo de envelhecimento, inflamação, obesidade e doenças neurodegenerativas (Wright et al., 2020). Enquanto antioxidantes, têm a capacidade de interagir com sistemas biológicos e de inibir ações prejudiciais ao organismo, nomeadamente na proteção antibacteriana e cardiovascular. Caracterizam-se também por apresentar um efeito anticancerígeno e neuroprotetor (Fakhri et al., 2020).

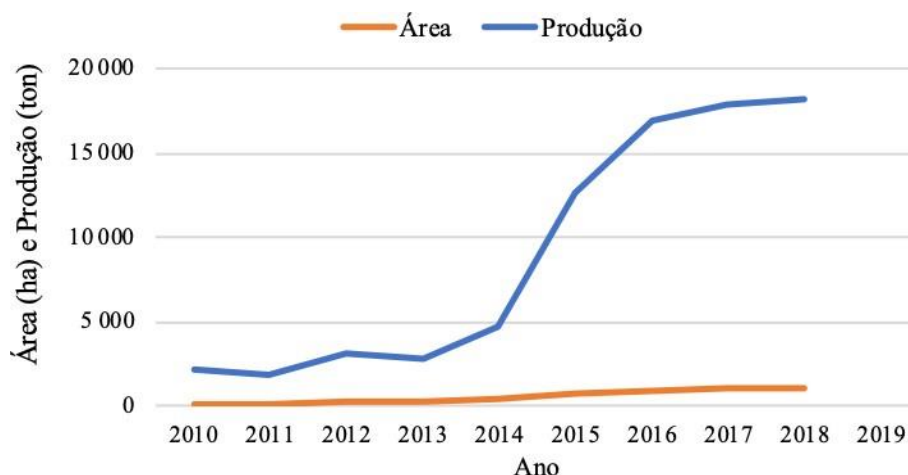
De um modo geral, os compostos fenólicos possuem um ou mais anéis aromáticos com um sistema aromático conjugado e um ou mais grupos hidroxilo. Estes atuam como antioxidantes devido à sua capacidade de ceder um eletrão ou um átomo de hidrogénio a um radical livre, permitindo que este seja convertido numa molécula não-reativa. Um mecanismo importante para a ação anti-inflamatória dos polifenóis, particularmente dos flavonoides (incluindo as antocianinas), é a sua capacidade de inibir a formação de eicosanoides a partir do ácido araquidónico através das vias da lipoxigenase (LOX) e da ciclooxygenase (COX), os quais podem aumentar o risco de doenças inflamatórias e cardiovasculares, ente outras (Zhang et al., 2019).

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* também têm descrito que as antocianinas e as antocianidinas, principalmente na forma de mistura, têm efeitos quimiopreventivos em relação ao cancro de mama, pele, esófago, pulmão, cavidade oral e trato gastrointestinal (Wang and Stoner, 2008).

### **2.2.3. A framboesa vermelha como fonte de antocianinas**

A framboesa vermelha é o fruto da framboeseira (*Rubus idaeus* L.), uma espécie da família Rosaceae, género *Rubus* e subgénero *Idaeobatus*. Este último compreende cerca de duas centenas de espécies, sendo *R. idaeus* a mais difundida na Europa e na América do Norte (Zhao, 2007). A framboesa vermelha é uma pseudobaga e caracteriza-se pelo sabor agridoce, aroma agradável, polpa com pequenas sementes e textura granulada. Em Portugal, a produção de framboesa tem maior expressão no Alentejo Litoral (Odemira), na Beira Interior (Fundão), em Trás-os-Montes (Bragança) e no Ribatejo e Oeste (GPP, 2017). Como demonstrado na **Figura 3**, trata-se de uma cultura com uma importância comercial crescente em Portugal, tendo sido produzidas 18229 toneladas de framboesa vermelha em 2018, numa área de 1149 hectares (GPP, 2018). Os frutos produzidos são,

de um modo geral, de boa qualidade e destinam-se maioritariamente ao mercado de exportação (GPP, 2018).

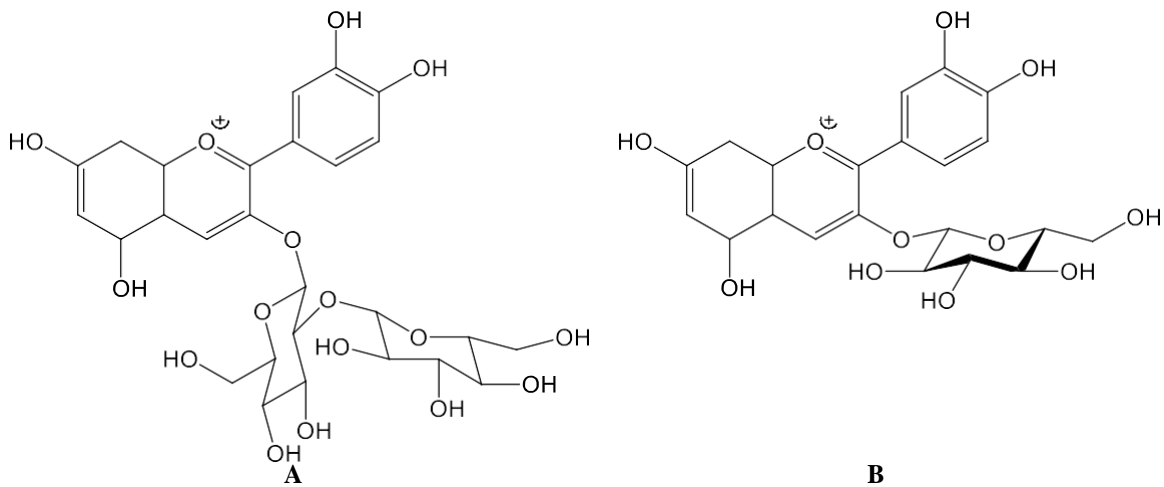


**Figura 3.** Gráfico da produção e área de cultivo de framboesa em Portugal. Fonte: GPP (2018).

Os elagitaninos e as antocianinas são os compostos fenólicos maioritários da framboesa vermelha (Kula et al., 2016; Mullen et al., 2003). Os elagitaninos são taninos hidrolisáveis complexos que apresentam pelo menos um grupo hexahidroxi-difenil esterificado com uma molécula de açúcar, geralmente glucose, ou outros compostos polihidroxi-lados (Mazur et al., 2014). As antocianinas são os pigmentos responsáveis pela cor característica da framboesa vermelha e as maioritárias são a cianidina-3-soforósido e a cianidina-3-glucósido (**Figura 4**). Outras antocianinas como a cianidina-3-rutinósido, a cianidina-3,5-diglucósido, a pelargonidina-3-glucósido, a pelargonidina-3-rutinósido, a pelargonidina-3-soforósido, a quercetina-3-glucósido, a quercetina-3-acetilglucósido e a quercetina-3-rutinósido também têm sido identificadas neste fruto (Anjos et al., 2020; Kula et al., 2016; Mazur et al., 2014; Seeram et al., 2006).

De acordo com alguns estudos, os génotipos de framboesa vermelha apresentam diferenças significativas no que concerne ao conteúdo de compostos fenólicos, incluindo flavonoides e antocianinas (Mazur et al., 2014; Mikulic-Petkovsek et al., 2012). De facto, o impacto da variedade ou cultivar e da época de colheita na composição fenólica já foi descrito como sendo mais pronunciado do que o causado por fatores edafoclimáticos individuais, como a temperatura, a exposição solar e as características do solo. No entanto, o efeito destes fatores sobre a composição química da framboesa está ainda pouco investigado. Também é de referir que a composição dos

genótipos de framboesa vermelha pode ser afetada de forma diferente pelas variações anuais (Mazur et al., 2014).



**Figura 4.** Estrutura química da cianidina-3-*O*-soforósido (A) e da cianidina-3-*O*-glucósido (B) encontradas na framboesa vermelha.

### 2.3. Métodos para obtenção de extratos ricos em antocianinas

A extração sólido-líquido ou maceração dinâmica é o método mais comum para recuperar compostos de elevado valor acrescentado a partir de matrizes vegetais. No entanto, estas metodologias mais convencionais podem favorecer a extração de outros compostos não pretendidos, tais como açúcares, ácidos orgânicos e proteínas, sendo por isso necessário realizar etapas subsequentes de purificação (e.g., extração em fase sólida) (Ongkowijoyo et al., 2018).

As antocianinas são moléculas polares; portanto, os solventes mais usados na sua extração devem ser misturas aquosas de etanol, metanol ou acetona (Deng et al., 2011; Ongkowijoyo et al., 2018). Também é comum usar solventes acidificados (0,1% de ácido fórmico ou acético) para evitar a sua degradação ou hidrólise. Os mais comuns são o metanol e o etanol acidificados (Ongkowijoyo et al., 2018). Estudos anteriores já descreveram que, aquando da extração de antocianinas a partir da polpa de uva, a extração com metanol é 20% mais eficaz do que com etanol e 73% mais eficaz do que quando se emprega somente água (Metivier et al., 1980). No entanto, o etanol é preferível devido à sua não toxicidade e permissão na indústria alimentar.

Apesar da maceração ser usada à escala industrial, este método convencional é frequentemente associado a altos gastos de energia e a longos tempos de extração (Belwal et al., 2018). De forma a melhorar a eficiência dos processos de extração, é

conveniente implementar desenhos experimentais que combinem o efeito das variáveis independentes ou fatores mais relevantes (tais como pH, temperatura, tipo de solvente e razão sólido-líquido), acoplados a uma metodologia de otimização como à metodologia de superfície de resposta (RSM) (Albuquerque et al., 2020; Zou et al., 2012). Esta ferramenta estatística tem sido usada para otimizar processos de extração e permite reduzir significativamente o número de ensaios laboratoriais (*runs*) necessários, comparativamente as abordagens convencionais *one-factor-at-a-time*. Assim, poderá ser possível melhorar o rendimento da extração e reduzir os custos associados ao consumo de solvente e ao tempo de extração.

A eficiência das extrações também é afetada pelas diferenças composicionais existentes entre as distintas matrizes vegetais, sendo por isso necessário otimizar estes processos de forma individual para cada matriz pretendida. A RSM permite otimizar as variáveis independentes de forma simultânea através da construção de modelos polinomiais que descrevem, dentro do intervalo experimental testado, as condições ótimas que maximizam as variáveis dependentes ou de resposta (Pinela et al., 2016). Esta ferramenta também permite avaliar as possíveis interações entre variáveis independentes que poderão decorrer sobre as respostas (e.g., teor de antocianinas). Além disso, permite determinar as condições ótimas de processamento que maximizam a extração.

A intensificação das extrações por ultrassom (EAU) pode melhorar a recuperação de compostos bioativos termossensíveis (tais como antocianinas), uma vez que pode ser realizada a temperatura relativamente baixa. Os efeitos mecânicos provocados das ondas de ultrassom proporcionam uma maior penetração do solvente nos tecidos vegetais, o que permite melhorar os fenómenos de transferência de massa, enquanto a rutura das paredes celulares promove a libertação de solutos para o solvente, aumentando assim a eficiência do processo (Chemat et al., 2017; Khadhraoui et al., 2018). Em termos de equipamentos, a baixa reprodutibilidade e potência são algumas das limitações dos banhos ultrassónicos, quando comparando com a extração assistida com um ultrassom de sonda. Em termos práticos, as sondas ultrassónicas de alta potência são preferencialmente utilizadas para efeitos de extração (**Figura 5**), uma vez que a intensidade ultrassónica é distribuída através de uma menor superfície, ou seja, apenas através da ponta da sonda (Chemat et al., 2017). Além disso, ao contrário da maceração dinâmica ou extração assistida por temperatura (EAT), em que se recorre a agitação mecânica, no método EAU, a agitação é promovida pela energia ultrassónica.



**Figura 5.** Equipamento ultrassónico utilizado em processos de extração.

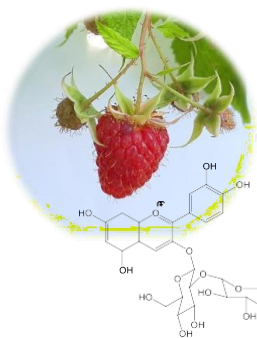
#### **2.4. Aplicação de antocianinas em produtos alimentares**

As antocianinas formam o maior grupo de pigmentos hidrossolúveis do reino vegetal. Estes têm sido estudados enquanto aditivos alimentares com ação corante, pois permitem obter tons entre o vermelho e o azul. Estas moléculas também são importantes no controlo do sabor e do aspeto de vários produtos alimentares (Khoo et al., 2017). A indústria alimentar pode assim recorrer a extratos ricos em antocianinas como importantes alternativas face aos corantes artificiais e, desta forma, ir de encontro a um público cada vez mais predisposto a consumir alimentos isentos de ingredientes artificiais. Além disso, o potencial antioxidante destas moléculas ajuda a retardar fenómenos de peroxidação lipídica, o que é útil na conservação de alimentos (Albuquerque et al., 2020).

As vantagens de incorporar ingredientes naturais em alimentos têm sido descritas por vários autores. Kamiloglu et al. (2017) constatou que o bagaço de cenoura preta é rico em polifenóis com potencial para melhorar o valor nutricional de produtos de pastelaria, sem alterar as características originais e a estabilidade desses produtos. Outro estudo, realizado com farinha de casca de feijão preto rica em antocianinas incorporada em bolachas sem glúten e em tortilhas, evidenciou que a adição desta farinha pode ser uma estratégia para aumentar os teores de antocianinas nesses alimentos; embora se tenha observado que a percentagem de retenção de bioativos tenha sido mais significativa nas tortilhas (Chávez-Santoscoy et al., 2016).

Em relação a questões de estabilidade, um estudo realizado com produtos de padaria (pão de forma, pão baguete e biscoitos) enriquecidos com antocianinas concluiu que os processos de cozedura e armazenamento não influenciam a estabilidade das

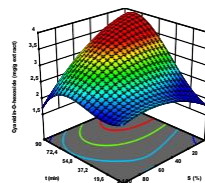
antocianinas (Karakaya et al., 2016). De uma forma geral, a viabilidade da aplicação de antocianinas a produtos alimentares deve ser acompanhada por estudos de estabilidade em diferentes condições de pH, temperatura e humidade relativa. É também necessário saber como controlar e processar a matéria-prima de forma a assegurar a qualidade no produto final, uma vez que estes parâmetros podem afetar a cor e a estabilidade das antocianinas, podendo estas ser degradadas com o aumento da temperatura.



Framboesa vermelha  
**ANTOCIANINAS**

**EAT**

Tempo  
Temperatura  
Porcentagem de etanol



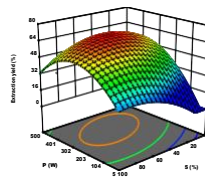
➡ **EXTRAÇÃO**

➡ **OTIMIZAÇÃO**

➡ **CORANTES  
BIOATIVOS**

**EAU**

Tempo  
Potência ultrassônica  
Porcentagem de etanol



**Atividade  
antioxidante**

**Atividade  
antibacteriana**



### 3. OBJETIVOS

Atualmente existe uma grande controvérsia em torno dos corantes alimentares artificiais (devido aos potenciais efeitos nocivos para a saúde do consumidor) e necessidade de encontrar novas fontes e métodos sustentáveis para obtenção de corantes de base natural. De facto, o número de corantes naturais alternativos aos artificiais é ainda baixo, pois a sua produção apresenta uma série de desafios científicos que precisam ser solucionados. Neste sentido, este trabalho equacionou várias questões de investigação que, por sua vez, se converteram em HIPÓTESES DE ESTUDO, tais como:

- 🌸 Será tecnologicamente viável obter corantes naturais a partir de framboesa vermelha?
- 🌸 Serão os métodos de extração EAT e EAU adequados para extrair antocianinas, de modo a obter extratos ricos nestes pigmentos naturais?
- 🌸 Qual dos métodos de extração (EAT versus EAU) será mais eficiente em termos de rendimento e condições de processamento?
- 🌸 Será que os extratos de framboesa vermelha ricos em antocianinas apresentam bioatividades de relevância para a sua utilização em produtos alimentares?

Para dar resposta às hipóteses de estudo apresentadas, este trabalho laboratorial, analítico e experimental teve como OBJETIVO GERAL produzir extratos de framboesa vermelha ricos em antocianinas com capacidade corante e atividade antioxidante e antibacteriana. Este objetivo foi ainda subdividido nos OBJETIVOS ESPECÍFICOS a seguir apresentados, os quais correspondem a etapas sequenciais do trabalho:

- 🌸 Preparação da amostra de framboesa vermelha por liofilização e redução a pó e posterior caracterização do perfil em antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de arranjo de díodos e espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>);
- 🌸 Implementação de desenhos de composto central para a otimização dos processos de extração de antocianinas assistidos por temperatura (EAT) e ultrassom (EAU);
- 🌸 Otimização dos processos de extração usando a metodologia RSM, considerando como variáveis de resposta o rendimento de extração (avaliado por um método gravimétrico) e o teor de antocianinas (quantificado por HPLC-DAD);
- 🌸 Validação experimental das condições ótimas de extração por EAT e EAU;

- 🌸 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos obtidos em condições otimizadas através dos ensaios *in vitro* de inibição da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da hemólise oxidativa (OxHLIA);
- 🌸 Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos obtidos em condições otimizadas através do ensaio colorimétrico rápido que utiliza o corante cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT) após realização do método da microdiluição.

Pretende-se que este estudo contribua para uma valorização alternativa da cultura da framboesa vermelha e para uma economia circular, em particular através da utilização dos bio-resíduos resultantes das etapas de produção, distribuição e armazenamento (*i.e.*, frutos maduros inadequados para comercialização) para produção de corantes naturais bioativos e, conseqüentemente, alimentos funcionais, nutracêuticos e outros produtos. Esta abordagem está alinhada com os objetivos do desenvolvimento sustentável da Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU, 2015). De uma forma mais indireta, também se pretende que os resultados venham a ter um impacto alargado no dia-a-dia do consumidor, o qual poderá vir a ter à sua disposição géneros alimentícios formulados com o ingrediente natural bioativo desenvolvido no âmbito deste trabalho a partir de framboesa vermelha.





## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Padrões e reagentes

O acetonitrilo de grau HPLC e o ácido trifluoroacético foram fornecidos pela Fisher Scientific, Lisboa, Portugal. Os padrões usados nas quantificações cromatográficas (cianidina-3-*O*-glucósido, da Extrasynthèse, Genay, França) e nos ensaios de bioatividade (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox), da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) apresentavam um nível de pureza  $\geq 96\%$ . O 2,2'-azobis-(2-metilpropionamida) dicloridrato (AAPH) também foi adquirido na Sigma-Aldrich. O cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT) foi adquirido na PanReac AppliChem, Barcelona, Espanha. O caldo de soja trípico (TSB) e o Mueller-Hinton (MH) foram obtidos na Biolab, Budapeste, Hungria. Os antibióticos imipenem e vancomicina foram adquiridos na Hikma Farmacêutica, S.A., Sintra, Portugal, enquanto a ampicilina foi adquirida na Fisher Scientific, Janssen Pharmaceutica NV, Bélgica. A água utilizada nos ensaios foi tratada com um sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, EUA). Os restantes reagentes e solventes eram de grau analítico e foram obtidos de fornecedores comuns.

### 4.2. Material vegetal

As amostras de framboesa vermelha (*Rubus idaeus* L., cultivar 'Kweli'), fornecidas pela empresa “Ponto Agrícola Unipessoal, Lda”, foram cultivadas em Tabuado, Marco de Canaveses, Portugal. Um lote de frutos maduros inadequados para comercialização (por se encontrarem fisicamente danificados) da colheita de setembro de 2018 foi liofilizado (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EUA), reduzido a pó (~20 mesh) numa trituradora de cozinha e homogeneizado para obter uma amostra representativa que foi mantida sob vácuo a -20 °C no escuro até posterior utilização.

### 4.3. Medições dos parâmetros de cor

A cor do pó liofilizado de framboesa foi medida com um colorímetro (modelo CR-400; Konica Minolta Sensing Inc., Japão) previamente calibrado contra um azulejo branco padrão. Os valores dos parâmetros de cor  $L^*$  [luminosidade, do preto (0) ao branco (100)],  $a^*$  [cromaticidade do verde (-) ao vermelho (+)] e  $b^*$  [cromaticidade do azul (-) ao amarelo (+)] foram registados utilizando o iluminar *C* e uma abertura de diafragma de 8 mm (Pinela et al., 2015). Posteriormente, para representar visualmente a cor

registada, os valores CIELAB foram convertidos em valores RGB (*Red* - vermelho, *Green* - verde, *Blue* - azul) utilizando um conversor de cor online (<http://colormine.org/>).

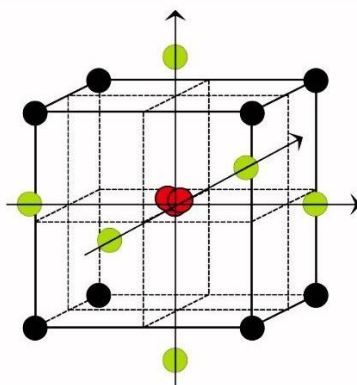
#### 4.4. Desenho experimental para os processos de extração

Para otimizar os processos de extração de antocianinas a partir de framboesa vermelha, foram implementados dois desenhos de composto central rotativo (DCCR) de três fatores com cinco níveis. Os valores codificados e naturais dos fatores ou variáveis independentes  $X_1$  (tempo:  $t$ , min),  $X_2$  (temperatura:  $T$ , °C, ou potência ultrassônica:  $P$ , W) e  $X_3$  (proporção de solvente:  $S$ , % etanol, v/v) são apresentados na **Tabela 1**. Estas variáveis independentes e os intervalos de valores foram selecionados com base em estudos anteriores do grupo de investigação (Albuquerque et al., 2020; López et al., 2018; Pinela et al., 2019).

**Tabela 1.** Valores codificados e naturais das variáveis independentes usadas nos processos de extração assistidos por temperatura (EAT) e ultrassons (EAU).

| Valores codificados | Valores naturais                   |          |             |                                   |         |             |
|---------------------|------------------------------------|----------|-------------|-----------------------------------|---------|-------------|
|                     | Extração assistida por temperatura |          |             | Extração assistida por ultrassons |         |             |
|                     | $t$ (min)                          | $T$ (°C) | $S$ (% v/v) | $t$ (min)                         | $P$ (W) | $S$ (% v/v) |
| -1.68               | 2                                  | 20       | 0           | 2                                 | 5       | 0           |
| -1                  | 20                                 | 34       | 20          | 11                                | 106     | 20          |
| 0                   | 46                                 | 55       | 50          | 24                                | 253     | 50          |
| +1                  | 72                                 | 76       | 80          | 36                                | 400     | 80          |
| +1.68               | 90                                 | 90       | 100         | 45                                | 500     | 100         |

O software Design-Expert, Versão 11 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, EUA), foi utilizado para gerar os 20 pontos experimentais dos desenhos experimentais através da inserção dos valores de cada uma das variáveis em termos de alfa ( $\alpha = 1,68$ ). Os desenhos DCCR contaram com 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais ou estrela (para permitir rotatividade e garantir que a variação da previsão do modelo seja constante em todos os pontos equidistantes do ponto central) e 6 repetições do ponto central (**Figura 6**). Além disso, as 20 execuções experimentais (*runs*) de cada processo de extração foram executadas de forma aleatória para minimizar o efeito de possível variabilidade nas respostas.



**Figura 6.** Representação dos vinte pontos experimentais no espaço experimental, incluindo oito pontos fatoriais (●), seis pontos axiais ou estrela (●) e seis pontos centrais (●).

#### 4.5. Métodos de extração

As amostras liofilizadas em pó de framboesa vermelha foram submetidas a extrações sólido-líquido assistidas por temperatura (EAT) e ultrassom (EAU). Os dois solventes utilizados nas extrações, nomeadamente o etanol e a água, foram selecionados devido à sua eficiência na extração de antocianinas (Boulekbache-Makhlouf et al., 2013) e por se encontrarem autorizados para utilização durante o processamento de géneros alimentícios e de componentes ou ingredientes alimentares (Directiva 2009/32/CE). Além disso, ambos os solventes possuem estatuto GRAS.

A extração EAT foi realizada em frascos de vidro selados para evitar a evaporação do solvente dentro de um banho-maria termostático para controlo da temperatura. Porções de amostra de massa conhecida (~600 mg) foram misturadas com 20 mL de solvente (misturas de etanol/água acidificadas com ácido cítrico até pH 3) e processadas sob agitação contínua com barras magnéticas a 500 rpm a diferentes níveis de  $t$  (2–90 min),  $T$  (20–90 °C) e  $S$  (0–100%) de acordo com o desenho DCCR (**Tabela 1**).

A extração EAU foi realizada com um sistema ultrassónico (Homogeneizador ultrassónico, modelo CY-500, Optic Ivymen System, Barcelona, Espanha) equipado com uma sonda de titânio. As amostras foram processadas a diferentes níveis de  $t$  (2–45 min),  $P$  (5–500 W) e  $S$  (0–100%) de acordo com o desenho DCCR (**Tabela 1**), enquanto que a temperatura foi mantida constante (temperatura ambiente).

Em ambos os métodos de extração, foi usada uma razão sólido/líquido de 30 g/L. Imediatamente após cada uma das extrações, as misturas foram centrifugadas a 4000g durante 10 min e os sobrenadantes foram recolhidos cuidadosamente com uma

pipeta de Pasteur. Uma porção do sobrenadante foi usada para determinar o rendimento de extração e o restante foi liofilizado para posterior quantificação de antocianinas.

#### 4.6. Determinação do rendimento de extração

O rendimento de cada extração foi determinado gravimetricamente em cadinhos de porcelana. Para isso, foram pipetados 4 mL de sobrenadante para os cadinhos previamente calcinados e pesados e o solvente foi evaporado numa estufa ventilada a 105 °C durante pelo menos 24 h. Após arrefecimento num exsiccador, os cadinhos contendo o extrato seco foram novamente pesados e o rendimento foi calculado de acordo com a **Equação 1**.

$$\text{Rendimento (\%, m/m)} = \frac{\text{massa de extrato seco}}{\text{massa de material vegetal}} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

#### 4.7. Análise cromatográfica de antocianinas

Os extratos secos de framboesa vermelha (~10 mg) foram redissolvidos em 2 mL de metanol/água (20:80, v/v) e filtrados através de filtros de seringa com um diâmetro de poro de 0,22 µm para vials âmbar. A análise foi realizada num sistema de HPLC (Dionex Ultimate 3000 UPLC, Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) equipado com uma bomba quaternária, um injetor automático (a 5 °C), um desgaseificador e um compartimento de coluna com termóstato. A separação cromatográfica foi feita numa coluna de fase reversa AQUA® C18 (5 µm, 150 mm × 4,6 mm) (Phenomenex, EUA) termostaticada a 35 °C. A eluição foi feita com (A) 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético em água e (B) 100% de acetonitrilo, aplicando o seguinte gradiente: 10% B durante até 3 min, de 10 a 15% B durante 12 min, 15% B durante 5 min, de 15 a 18% B durante 5 min, de 18 a 30% B durante 20 min, de 30 a 35% B durante 5 min e de 35 a 10% B durante 10 min (Jabeur et al., 2017). O tempo total de análise foi de 60 min, seguido do acondicionamento da coluna durante 10 min. O caudal foi de 0,5 mL/min e o volume de injeção foi de 10 µL.

O sistema de HPLC encontrava-se acoplado a um detetor de arranjo de díodos (DAD, a um comprimento de onda de 520 nm) e a um espectrómetro de massa (MS) com um analisador Ion Trap Linear (LTQ XL) (Thermo Finnigan, San Jose, CA, EUA) equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) a operar em modo positivo. O azoto foi utilizado como gás de revestimento (50 psi); e o sistema foi operado com uma tensão de pulverização de 4,8 kV, uma temperatura da fonte de 320

°C e uma tensão capilar de 14 V. O deslocamento da lente do tubo foi mantido a uma tensão de 75 V. Foi abrangida uma amplitude de massas de  $m/z$  100 a 1500. Foi utilizada uma energia de colisão de 20 (unidades arbitrárias).

A identificação foi realizada comparando os tempos de retenção, o padrão de fragmentação e os espectros de UV-vis das antocianinas identificadas com os obtidos com o padrão comercial e a informação disponíveis na literatura. Os compostos identificados foram quantificados utilizando a curva de calibração ( $y = 134578x - 3 \times 10^6$ ;  $r^2 = 0.9986$ ; limite de detecção (LOD) = 0.25  $\mu\text{g/mL}$ ; limite de quantificação (LOQ) = 0.83  $\mu\text{g/mL}$ ) construída com o padrão de cianidina-3-*O*-glucósido [20–200  $\mu\text{g/mL}$ ]. Os dados foram adquiridos e processados com o software Xcalibur® (Thermo Finnigan, San Jose, CA, EUA) e os resultados foram expressos em mg por g de extrato.

#### 4.8. Modelação dos processos de extração e análise estatística

Os dois processos de extração de antocianinas a partir de framboesa vermelha foram otimizados considerando as variáveis dependentes  $Y_1$  (rendimento de extração),  $Y_2$  (teor de cianidina-3-*O*-soforósido, C3S),  $Y_3$  (teor de cianidina-3-*O*-glucósido, C3G) e  $Y_4$  (teor total de antocianinas). Os procedimentos de ajuste, a estimativa de coeficientes e a verificação estatística dos modelos foram realizados usando o software Design-Expert, versão 11 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, EUA). Uma análise da variância (ANOVA) foi usada para avaliar a significância dos modelos gerados e dos termos que compõem esses modelos, assim como a falta de ajuste. O método para testar a significância estatística foi realizado calculando o valor de  $p$  a partir do valor  $F$ , considerando-se a existência de significância para  $p < 0,05$ . Apenas os termos estatisticamente significativos foram usados na construção dos modelos.

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ), o coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{\text{adj}}$ ) e a precisão adequada, interpretados como a proporção de variabilidade da variável dependente explicada pelo modelo (Albuquerque et al., 2018), foram utilizados para estimar a adequação das equações polinomiais às respostas. Os valores de  $R^2$  e  $R^2_{\text{adj}}$  são os principais indicadores da significância do modelo. O  $R^2$  representa a variação em torno da média explicada pelo modelo, enquanto que o  $R^2_{\text{adj}}$  resulta de um ajuste que considera o número de variáveis e termos significativos no modelo. Os valores próximos a 1 ilustram uma boa concordância entre resultados teóricos e experimentais. Para a Precisão Adequada, que é uma medida da taxa de ruído, o valor deverá ser superior a 4 (Iberahim et al., 2019).

A falta de ajuste (*lack-of-fit*) é uma medida da qualidade do ajuste do modelo aos dados experimentais. Este teste indica se o modelo descreve adequadamente a relação funcional entre as variáveis independentes e a resposta obtida. Desta forma, a falta de ajuste deve ser não significativa ( $p > 0,05$ ) (Albuquerque et al., 2018).

O software Design-Expert também foi usado para gerar os gráficos de superfície de resposta.

#### **4.9. Validação experimental dos modelos e avaliação do potencial corante e bioativo dos extratos produzidos em condições otimizadas**

As condições otimizadas de EAT e EAU que maximizam a recuperação de antocianinas a partir de framboesa foram utilizadas para obter dois extratos ricos nestes pigmentos, seguindo o procedimento anteriormente descrito na seção 4.5. Estes novos extratos foram usados no processo de validação experimental dos modelos teóricos, realizado através da análise e comparação das respostas experimentais (rendimento de extração e teor de antocianinas) destes extratos com os valores previstos pelo modelo. A cor destes extratos também foi avaliada, bem como a sua atividade antioxidante e antimicrobiana.

##### **4.9.1. Potencial corante**

Os parâmetros de cor CIELAB dos extratos obtidos em condições ótimas de EAT e EAU foram medidos conforme explicado na seção 4.3. e convertidos em valores RGB.

##### **4.9.2. Capacidade de inibição da peroxidação lipídica**

A capacidade de inibição da peroxidação lipídica foi avaliada pela inibição da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Inicialmente, foi preparada uma suspensão de células de cérebro de porco (obtido num matadouro local), homogeneizada numa solução tampão Tris-HCl a 20 mM, pH 7,4, na razão 1:2 (*m/v*) e depois centrifugada a 3250g durante 10 min. Seguidamente, os extratos foram redissolvidos em água e submetidos a diluições sucessivas de forma a obter concentrações de 0,02 a 10 mg/mL.

Em eppendorfs de 2 mL, foram adicionados 200  $\mu$ L das diferentes diluições dos extratos preparadas (ou o solvente de extração, no caso do controlo), 100  $\mu$ L de ácido ascórbico (0,1 mM), 100  $\mu$ L de sulfato de ferro (10 mM) e 100  $\mu$ L de sobrenadante da suspensão de cérebro preparada. A mistura foi incubada a 37 °C durante 1 h.

A reação foi interrompida pela adição de 500 µL de ácido tricloroacético a 28%. Para promover a formação de complexos cor de rosa entre o malondialdeído (MDA, um produto da peroxidação lipídica) e o ácido tiobarbitúrico (TBA), foram adicionados 380 µL de TBA a 2% (*m/v*) e a mistura foi aquecida a 80 °C durante 20 min para promover a formação dos complexos MDA-2TBA. O precipitado proteico presente no eppendorf foi separado por centrifugação a 4000g durante 5 min (Microfuge 16, Beckman Coulter) e a intensidade da cor do sobrenadante foi medida a 532 nm (espectrofotômetro Specord 200, Analytik Jena, Jena, Alemanha).

A percentagem de inibição da peroxidação lipídica de cada concentração de extrato testada foi calculada de acordo com a **Equação 2**.

$$\text{Percentagem de inibição (\%)} = \frac{AC - AE}{AC} \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

onde *AC* é a absorvância do controlo e *AE* a absorvância da solução de extrato.

A concentração de extrato (µg/mL) responsável por metade do efeito máximo ou por 50% da inibição da peroxidação lipídica (valor de EC<sub>50</sub>) foi calculada a partir do gráfico da percentagem de inibição da formação de TBARS em função da concentração de extrato.

#### 4.9.3. Atividade anti-hemolítica

O ensaio da inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA) foi feito com eritrócitos isolados de sangue de ovelhas saudáveis, cuja colheita foi realizada por profissionais qualificados. A amostra de sangue foi imediatamente centrifugada (Thermo Scientific - Heraeus Multifuge X1R, Waltham, MA, USA) a 1000g durante 5 min a 10 °C e o sobrenadante foi descartado. Os eritrócitos foram lavados, primeiro com NaCl (150 mM) e depois três vezes com PBS a pH 7,4, com centrifugação e remoção do sobrenadante a cada lavagem (Evans et al., 2013). Os eritrócitos isolados foram usados para preparar uma solução a 2,8% (*v/v*), usando PBS como solvente.

Em placas de 48 poços, 200 µL da solução de eritrócitos foram misturados com 400 µL de solução de extrato (0,03–1 mg/mL em PBS, preparadas por diluição sucessiva), de trolox (7,81– 250 µg/mL em PBS, controlo positivo), de PBS (controlo) ou de água destilada (para promover hemólise). As placas foram pré-incubadas a 37 °C com agitação durante 10 min e, depois disso, foram adicionados 200 µL de AAPH (160 mM) e a densidade ótica foi medida a 690 nm a cada ~10 min num leitor de microplacas (Bio-Tek Instruments, ELX800) até hemólise completa (Lockowandt et al., 2019).

A percentagem da população de eritrócitos que permaneceu intacta (*PE*) foi calculada de acordo com a **Equação 3**, utilizando o software GraphPad Prism 6.

$$PE (\%) = \frac{St - CHO}{S0 - CHO} \times 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

onde *St* e *S0* correspondem à densidade ótica da solução de extrato nos instantes *t* e 0 min, respetivamente, e *CHO* é a densidade ótica da mistura onde ocorreu hemólise completa (promovida pela adição de água destilada) no tempo zero (primeira leitura).

Os resultados foram expressos como tempo de atraso da hemólise ( $\Delta t$ ), calculado de acordo com a **Equação 4**.

$$\Delta t (\text{min}) = Ht_{50}(\text{amostra}) - Ht_{50}(\text{controlo}) \quad \text{Eq. (4)}$$

onde  $Ht_{50}$  é o tempo (min) correspondente a 50% de hemólise obtido graficamente a partir da curva de hemólise de cada uma das concentrações de extrato e do controlo (PBS).

Por fim, os valores de  $\Delta t$  obtidos foram correlacionados com as concentrações de extrato testadas, o que permitiu calcular a concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) necessária para proteger 50% da população de eritrócitos (valor de  $IC_{50}$ ) durante um  $\Delta t$  de 60 min.

#### **4.9.4. Atividade antibacteriana**

Os extratos (~100 mg) foram redissolvidos a uma concentração de 20 mg/mL usando numa mistura de DMSO e meio de cultura Mueller-Hinton (5:95, v/v) e depois testados contra microrganismos isolados de pacientes internados em unidades de saúde locais de Bragança e Vila Real, Portugal. A análise incluiu bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*) e bactérias Gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina - MRSA). A identificação dos microrganismos e os testes de suscetibilidade foram feitos utilizando painéis MicroScan (MicroScan®, Siemens Medical Solutions Diagnostic) pelo método de microdiluição em placa. Os critérios de interpretação foram baseados em Breakpoints Interpretativos, conforme indicado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016) e pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2020).

A atividade antibacteriana dos extratos foi avaliada pelo método de microdiluição em placa e pelo ensaio colorimétrico do cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT) (Kuate et al., 2011). A solução dos extratos a 20 mg/mL (190  $\mu\text{L}$ ) foi colocada no

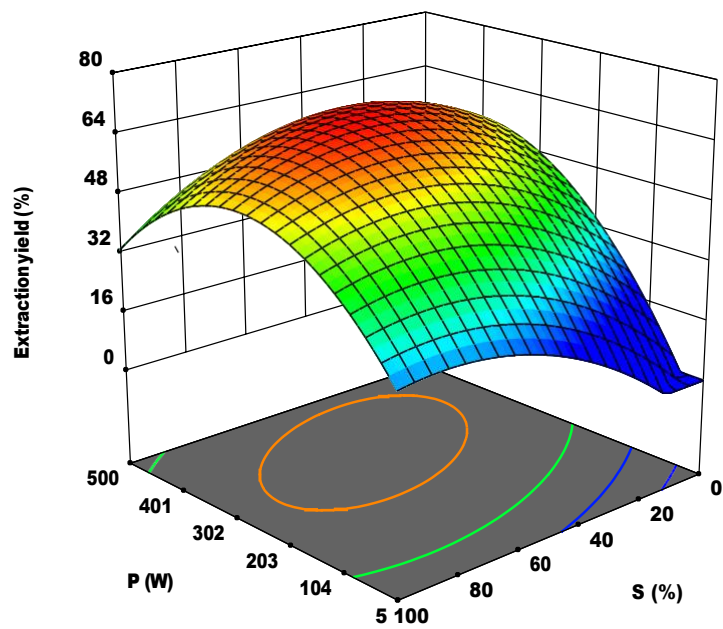
primeiro poço de uma placa de 96 poços e os restantes foram preenchidos com 90 µL de meio de cultura. Posteriormente foram feitas diluições sucessivas retirando 90 µL do primeiro poço para o segundo e assim sucessivamente até à obtenção de uma concentração de 0,156 mg/mL. A cada poço da placa, foram adicionados 10 µL de inóculo bacteriano, após preparação previa com turvação correspondente a 0,5 na escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL), ou seja, com um valor de absorvância compreendido entre 0,08–0,1 nm. As microplacas foram incubadas numa estufa a 37 °C durante 24 h. Os ensaios foram realizados em duplicado. De referir que foram realizados três controlos negativos: o primeiro apenas com meio de cultura com 5% de DMSO; o segundo com meio de cultura, bactéria e antibiótico; e o terceiro apenas com o extrato. Os antibióticos ampicilina (20 mg/mL), imipenem (1 mg/mL) e vancomicina (1 mg/mL) foram utilizados como controlos positivos. Também foi considerado um controlo positivo com o microrganismo e o meio de cultura com 5% de DMSO.

Decorridas as 24 h, foram adicionados 40 µL de INT a 0,2 mg/mL em todos os poços com posterior incubação a 37 °C durante 30 min. Os microrganismos viáveis provocaram uma alteração na cor de amarelo para cor-de-rosa. A concentração mínima inibitória (MIC) foi definida como a menor concentração de extrato (mg/mL) capaz de inibir o crescimento bacteriano e a concentração mínima bactericida (MBC) como a menor concentração (mg/mL) capaz de provocar um efeito bactericida.

#### ***4.9.5. Análise estatística***

Para os resultados de cor e atividade antioxidante, as diferenças entre as amostras foram avaliadas através de uma análise de variância (ANOVA) com um fator. O cumprimento dos requisitos da ANOVA foi testado por meio dos testes de Shapiro-Wilk e de Levene para avaliar a normalidade e homogeneidade da variância dos dados, respetivamente. Os resultados foram comparados usando os testes de comparação múltipla de Tukey HSD ou T2 de Tamhane, quando a homocedasticidade foi verificada ou não, respetivamente. Além disso, a existência de diferenças significativas entre os valores ótimos de resposta experimental e prevista pelo modelo foi avaliada aplicando um teste *t* de Student pareado. Os testes estatísticos foram realizados com um nível de significância de 5% usando o software SPSS Statistics (IBM SPSS Statistics for Windows, Versão 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.).







## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A natureza intrínseca das matrizes vegetais, o tipo de solvente de extração e a suscetibilidade das antocianinas à degradação provocada por certas condições de temperatura, pH e tempos de processamento influenciam sua recuperação e integridade (Martins et al., 2016). A seleção de métodos de intensificação de extração adequados e a determinação de condições de processamento que maximizem a recuperação de compostos de elevado valor acrescentado tem recebido particular interesse no ramo científico e industrial. Deste modo, têm sido feitos esforços no sentido de desenvolver processos de extração mais eficientes e sustentáveis, capazes de melhorar o rendimento e a seletividade da extração (Chen et al., 2007; López et al., 2018; Pinela et al., 2019; Sun et al., 2007). A comparação de resultados obtidos com diferentes técnicas de extração pode, no entanto, ser uma tarefa muito difícil, uma vez que as variações composicionais e físico-químicas existentes entre matrizes vegetais dificultam uma extrapolação direta. O presente estudo investigou o potencial de dois métodos de extração sólido-líquido para recuperar antocianinas a partir de framboesa vermelha.

### 5.1. Perfil antociânico da framboesa vermelha e resultados experimentais para a otimização dos processos de extração

Os frutos vermelhos têm sido descritos como alimentos ricos em polifenóis com potencial antioxidante, particularmente em antocianinas (Anjos et al., 2020; De Souza et al., 2014). A análise de HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> permitiu identificar dois glicosídeos de cianidina nos extratos de framboesa vermelha, nomeadamente cianidina-3-*O*-soforósido (identificado com base no ião pseudomolecular [M-H]<sup>+</sup> de *m/z* 611 e no fragmento de *m/z* 287) e cianidina-3-*O*-glucósido (identificado com base no ião pseudomolecular [M-H]<sup>+</sup> de *m/z* 449 e no fragmento de *m/z* 287) (**Tabela 2**). Estes dois compostos foram anteriormente descritos como os principais pigmentos da framboesa vermelha (Beekwilder et al., 2005; Bowen-Forbes et al., 2010; Sariburun et al., 2010) e relacionados com a cor vermelho-púrpura deste pequeno fruto.

Conforme apresentado na **Tabela 3**, a cianidina-3-*O*-soforósido (C3S) predominou sobre a cianidina-3-*O*-glucósido (C3G). Os teores de C3S variaram de 3,64–5,51 mg/g de extrato e de 3,63–5,9 mg/g de extrato e os teores de C3G variaram de 2,27–3,49 mg/g de extrato e de 2,61–3,9 mg/g de extrato, com os métodos EAT e EAU, respetivamente.

**Tabela 2.** Antocianinas identificadas no extrato de framboesa vermelha. É apresentado o tempo de retenção (Tr), o comprimento de onda de absorção máxima na região UV-vis ( $\lambda_{\max}$ ), o ião pseudomolecular e os fragmentos MS<sup>2</sup> (abundância relativa entre parêntesis).

| Pico | Tr (min) | $\lambda_{\max}$ (nm) | [M-H] <sup>+</sup> (m/z) | Fragmentos MS <sup>2</sup> (m/z) | Tentativa de identificação     |
|------|----------|-----------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| 1    | 11.48    | 515                   | 611                      | 287(100)                         | Cianidina-3-O-soforósido (C3S) |
| 2    | 14.26    | 512                   | 449                      | 287(100)                         | Cianidina-3-O-glucósido (C3G)  |

No método EAT, as concentrações mais altas foram obtidas com os *runs* 2 e 7, que combinaram um tempo médio-alto (72 min; nível +1) com uma temperatura e concentração de solvente média-baixa (34 °C a 20% etanol/água, v/v; nível -1) ou um tempo de processamento médio-baixo (20 min; nível -1) com uma temperatura e percentagem de solvente média-alta (76 °C e 80% etanol/água, v/v; nível +1), respetivamente. Por sua vez, as maiores concentrações de antocianina no processo EAU foram alcançadas com o *run* 1, caracterizado por condições de processamento médias-baixas (11 min, 106 W e 20% etanol/água, v/v; nível -1). Neste método, o aumento no tempo e solvente para condição média-alta (36 min e 80% etanol/água, v/v) levou a valores mais baixos (*run* 6). Em relação aos seis pontos centrais replicados do desenho DCCR (**Tabela 3**), estes resultaram em valores médios de 7,7±0,1 mg/g e 7,2±0,1 mg/g para os métodos EAT e EAU, respetivamente.

O rendimento de extração (ou percentagem de massa de extrato, m/m) também foi significativamente afetado pelas 20 combinações dos desenhos DCCR de cinco níveis implementados para otimizar os processos EAT e EAU. Este variou de 41,22 a 60,36% com o método EAT e de 18,55 a 66,23% com o método EAU (**Tabela 3**). Portanto, a variância mais acentuada foi associada ao processo EAU, com as condições de extração em níveis médios (pontos centrais) originando rendimentos mais elevados, enquanto que uma diminuição nos valores de potência ultrassónica e solvente e um aumento no tempo de extração (*run* 2) resultaram no valor mais baixo.

**Tabela 3.** Respostas experimentais obtidas nas condições de extração definidas pelo desenho DCCR para o rendimento de extração (% , *m/m*) e teores de cianidina-3-*O*-soforósido (C3S, mg/g extrato), cianidina-3-*O*-glucósido (C3G, mg/g extrato) e de ambas as antocianinas (total, mg/g extrato) em função do método de extração. Os valores naturais das variáveis independentes são apresentados na **Tabela 1**.

| Run | Desenho experimental |            |          | Respostas experimentais            |      |      |       |                                  |      |      |       |
|-----|----------------------|------------|----------|------------------------------------|------|------|-------|----------------------------------|------|------|-------|
|     | <i>t</i>             | <i>T/P</i> | <i>S</i> | Extração assistida por temperatura |      |      |       | Extração assistida por ultrassom |      |      |       |
|     | <i>min</i>           | °C/W       | % (v/v)  | η                                  | C3S  | C3G  | Total | η                                | C3S  | C3G  | Total |
| 1   | -1                   | -1         | -1       | 54,74                              | 4,13 | 2,45 | 6,58  | 25,68                            | 5,90 | 3,90 | 10,00 |
| 2   | +1                   | -1         | -1       | 58,11                              | 5,51 | 3,49 | 9,00  | 18,55                            | 4,15 | 2,80 | 6,95  |
| 3   | -1                   | +1         | -1       | 60,36                              | 3,70 | 2,43 | 6,13  | 51,12                            | 5,02 | 3,28 | 8,30  |
| 4   | +1                   | +1         | -1       | 60,24                              | 4,27 | 2,62 | 7,05  | 57,74                            | 4,31 | 2,67 | 6,98  |
| 5   | -1                   | -1         | +1       | 57,02                              | 4,74 | 2,58 | 7,18  | 46,60                            | 4,89 | 3,24 | 8,13  |
| 6   | +1                   | -1         | +1       | 51,78                              | 4,28 | 2,76 | 7,51  | 48,93                            | 3,63 | 2,61 | 6,24  |
| 7   | -1                   | +1         | +1       | 50,00                              | 5,31 | 3,19 | 8,50  | 61,11                            | 4,23 | 2,76 | 6,98  |
| 8   | +1                   | +1         | +1       | 45,45                              | 3,72 | 2,35 | 6,07  | 60,37                            | 4,34 | 2,76 | 7,09  |
| 9   | -1,68                | 0          | 0        | 60,00                              | 4,86 | 2,91 | 7,58  | 56,39                            | 4,02 | 2,85 | 6,90  |
| 10  | +1,68                | 0          | 0        | 59,83                              | 3,65 | 2,28 | 6,21  | 59,84                            | 4,44 | 3,26 | 7,31  |
| 11  | 0                    | -1,68      | 0        | 41,22                              | 5,08 | 3,15 | 8,22  | 24,22                            | 3,89 | 2,73 | 6,62  |
| 12  | 0                    | +1,68      | 0        | 56,93                              | 4,37 | 2,75 | 7,11  | 54,00                            | 4,73 | 3,11 | 7,84  |
| 13  | 0                    | 0          | -1,68    | 53,50                              | 4,01 | 2,57 | 6,58  | 46,23                            | 5,27 | 2,81 | 8,49  |
| 14  | 0                    | 0          | +1,68    | 50,82                              | 4,12 | 2,64 | 6,76  | 55,92                            | 4,47 | 3,18 | 7,63  |
| 15  | 0                    | 0          | 0        | 50,62                              | 4,69 | 3,00 | 7,69  | 63,42                            | 4,28 | 2,78 | 7,06  |
| 16  | 0                    | 0          | 0        | 48,85                              | 4,68 | 2,97 | 7,65  | 65,18                            | 4,22 | 2,95 | 7,17  |
| 17  | 0                    | 0          | 0        | 55,35                              | 4,80 | 3,00 | 7,80  | 66,21                            | 4,40 | 2,83 | 7,23  |
| 18  | 0                    | 0          | 0        | 52,00                              | 4,66 | 2,95 | 7,76  | 64,65                            | 4,42 | 2,86 | 7,28  |
| 19  | 0                    | 0          | 0        | 53,70                              | 4,66 | 2,93 | 7,59  | 51,58                            | 4,26 | 2,85 | 7,35  |
| 20  | 0                    | 0          | 0        | 52,93                              | 4,56 | 2,96 | 7,52  | 66,23                            | 4,36 | 2,86 | 7,25  |

*t*: tempo; *T*: temperatura; *P*: potência ultrassônica; *S*: solvente (percentagem de etanol); η: rendimento de extração; C3S: cianidina-3-*O*-soforósido; C3G: cianidina-3-*O*-hexósido; Total: C3S + C3G.

## 5.2. Ajuste e verificação estatística dos modelos

A metodologia RSM é uma ferramenta estatística adequada para modelar e otimizar processos de extração envolvendo uma ou mais variáveis de resposta e permite determinar condições ótimas de processamento com um número reduzido de ensaios experimentais, quando comparado com abordagens convencionais de *one-factor-at-a-time* que não têm em consideração as possíveis interações entre variáveis (Leichtweis et al., 2019). Para desenvolver modelos teóricos capazes de prever e explicar os efeitos das variáveis independentes do processo numa determinada resposta, é necessário avaliar e assegurar a precisão do seu ajuste aos dados experimentais. Neste estudo, os valores de resposta apresentados na **Tabela 3** foram ajustados a um modelo de regressão polinomial usando o software Design-Expert. Porém, nem todos os parâmetros foram usados na construção dos modelos, uma vez que alguns dos coeficientes não eram significativos (**Tabela 4**); os significativos foram avaliados com um nível de confiança de 95%. Os resultados da ANOVA e da análise de regressão são apresentados na **Tabela 4**. Os modelos polinomiais desenvolvidos, expressos em valores codificados, são apresentados nas **Equações 5–12**.

Para o método EAT:

$$Y_{Yield} = 52.34 - 3.64T + 2.89t^2 - 1.63tS - 2.64TS - 2.85t^2S + 2.94T^3 \quad \text{Eq. (5)}$$

$$Y_{C3S} = 4.67 - 0.36t - 0.21T - 0.12t^2 - 0.19S^2 - 0.24tT - 0.50tS + 0.21TS + 0.35tT^2 \quad \text{Eq. (6)}$$

$$Y_{C3G} = 2.97 + 0.21t - 0.10T - 0.13t^2 - 0.12S^2 - 0.23tT - 0.24tS + 0.14TS - 0.14t^3 \quad \text{Eq. (7)}$$

$$Y_{Total} = 7.66 - 0.28t - 0.32T - 0.18t^2 - 0.32S^2 - 0.54tT - 0.67tS + 0.28TS - 0.18tTS + 0.45tT^3 \quad \text{Eq. (8)}$$

Para o método EAU:

$$Y_{Yield} = 62.96 + 10.30P - 8.90P^2 - 4.67S^2 - 4.84PS \quad \text{Eq. (9)}$$

$$Y_{C3S} = 4.30 + 0.12t - 0.27P - 0.27S + 0.21S^2 + 0.30tP + 0.16tS + 0.10PS - 0.57tP^2 + 0.18P^3 \quad \text{Eq. (10)}$$

$$Y_{C3G} = 2.85 + 0.12t + 0.11P + 0.14S + 0.07t^2 + 0.04S^2 + 0.14tP + 0.14tS + 0.05PS - 0.25t^2P - 0.30t^2S - 0.41tP^2 \quad \text{Eq. (11)}$$

$$Y_{Total} = 7.22 + 0.12t + 0.36P - 0.26S + 0.32S^2 + 0.47tP + 0.33tS + 0.18PS - 0.62t^2P - 0.22t^2S - 0.89tP^2 \quad \text{Eq. (12)}$$

**Tabela 4.** Valores paramétricos da equação polinomial para os critérios de resposta e informações estatísticas do procedimento de ajuste dos modelos para ambos os processos de extração. Os parâmetros sobrescritos 1, 2 e 3 representam as variáveis: tempo, temperatura ou potência e solvente, respetivamente.

| Efeito                        | Extração assistida por temperatura (EAT) |            |            |            | Extração assistida por ultrassons (EAU) |            |            |            |
|-------------------------------|--|------------|------------|------------|---|------------|------------|------------|
|                               | $\eta$                                   | C3S        | C3G        | Total      | $\eta$                                  | C3S        | C3G        | Total      |
| $b_0$                         | 52.3±0.6                                 | 4.67±0.04  | 2.97±0.02  | 7.66±0.05  | 63±2                                    | 4.30±0.03  | 2.85±0.02  | 7.22±0.05  |
| $b_1$                         | ns                                       | -0.36±0.04 | 0.21±0.03  | -0.28±0.05 | ns                                      | 0.12±0.04  | 0.12±0.02  | 0.12±0.05  |
| $b_2$                         | -4±1                                     | -0.21±0.03 | -0.10±0.01 | -0.32±0.03 | 10±1                                    | -0.27±0.06 | 0.11±0.02  | 0.36±0.05  |
| $b_3$                         | ns                                       | ns         | ns         | ns         | ns                                      | -0.27±0.03 | 0.14±0.02  | -0.26±0.05 |
| $b_{11}$                      | 2.9±0.5                                  | -0.12±0.03 | -0.13±0.01 | -0.18±0.03 | ns                                      | ns         | 0.07±0.01  | ns         |
| $b_{22}$                      | ns                                       | ns         | ns         | ns         | -9±1                                    | ns         | ns         | ns         |
| $b_{33}$                      | ns                                       | -0.19±0.03 | -0.12±0.01 | -0.32±0.03 | -5±1                                    | 0.21±0.02  | 0.04±0.01  | 0.32±0.03  |
| $b_{12}$                      | ns                                       | -0.24±0.04 | -0.23±0.02 | -0.54±0.04 | ns                                      | 0.30±0.03  | 0.14±0.02  | 0.47±0.04  |
| $b_{13}$                      | -1.6±0.7                                 | -0.50±0.04 | -0.24±0.02 | -0.67±0.04 | ns                                      | 0.16±0.03  | 0.14±0.02  | 0.33±0.04  |
| $b_{23}$                      | -2.6±0.7                                 | 0.21±0.04  | 0.14±0.02  | 0.28±0.04  | -5±2                                    | 0.10±0.03  | 0.05±0.02  | 0.18±0.04  |
| $b_{111}$                     | ns                                       | ns         | -0.14      | ns         | ns                                      | ns         | ns         | ns         |
| $b_{222}$                     | ns                                       | ns         | ns         | ns         | ns                                      | 0.18±0.03  | ns         | ns         |
| $b_{333}$                     | 2.9±0.6                                  | ns         | ns         | ns         | ns                                      | ns         | ns         | ns         |
| $b_{123}$                     | ns                                       | ns         | ns         | -0.18±0.04 | ns                                      | ns         | ns         | ns         |
| $b_{112}$                     | ns                                       | ns         | ns         | ns         | ns                                      | ns         | -0.25±0.03 | -0.62±0.07 |
| $b_{113}$                     | -3±1                                     | ns         | ns         | ns         | ns                                      | ns         | -0.30±0.03 | -0.22±0.07 |
| $b_{122}$                     | ns                                       | 0.35±0.05  | ns         | 0.45±0.07  | ns                                      | -0.57±0.03 | -0.41±0.03 | -0.89±0.07 |
| <b>Estatística</b>            |  |            |            |            |   |            |            |            |
| Valor F do modelo             | 14.81                                    | 46.44      | 102.09     | 61.98      | 15.91                                   | 53.09      | 51.48      | 76.62      |
| Falta de ajuste               | ns                                       | ns         | ns         | ns         | ns                                      | ns         | ns         | ns         |
| R <sup>2</sup>                | 0.9303                                   | 0.9810     | 0.9892     | 0.9884     | 0.9349                                  | 0.9833     | 0.9888     | 0.9924     |
| R <sup>2</sup> <sub>adj</sub> | 0.8674                                   | 0.9599     | 0.9795     | 0.9725     | 0.8759                                  | 0.9648     | 0.9696     | 0.9795     |
| Precisão adequada             | 14.86                                    | 23.68      | 38.23      | 30.20      | 12.05                                   | 31.77      | 30.21      | 40.08      |
| C.V. (%)                      | 3.46                                     | 2.29       | 1.59       | 1.71       | 9.55                                    | 2.12       | 1.79       | 1.59       |

$\eta$ : rendimento de extração; C3S: cianidina-3-*O*-soforósido; C3G: cianidina-3-*O*-glucósido; Total: C3S + C3G; R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação; R<sup>2</sup><sub>adj</sub>: coeficiente de determinação ajustado; C.V.: coeficiente de variação.

Nos modelos matemáticos apresentados nas **Equações 5–12**, os coeficientes à frente de cada termo ilustram o efeito das variáveis independentes e a interação entre elas. Os valores paramétricos representam a variação esperada na resposta por alteração do valor de um determinado fator, quando todos os outros fatores são mantidos constantes. Desta forma, quanto maior o valor paramétrico, mais significativo é o peso da variável. Além disso, um efeito sinérgico é indicado por um sinal positivo, enquanto que um sinal negativo indica um antagonismo (Pinela et al., 2019). Portanto, a complexidade das tendências de extração pode ser ilustrada pelos modelos desenvolvidos. Em cada equação, o valor da intercepção corresponde à resposta média global de todas as combinações da metodologia RSM (**Tabela 3**). No processo EAT, estes são menores para o rendimento de extração e maiores para os teores de antocianinas, o que de certa forma traduz uma maior seletividade deste método de extração para os compostos-alvo.

Todos os modelos apresentaram uma falta de ajuste não significativa (*ns*) ( $p > 0,05$ ) e uma precisão adequada maior que 12, o que indica que as equações modelo descrevem adequadamente os efeitos das variáveis independentes nas respostas avaliadas (Iberahim et al., 2019). Os coeficientes  $R^2$  e  $R^2_{adj}$  foram superiores a 0,93 e 0,86 em todos os casos, respetivamente (**Tabela 4**), indicando que a variabilidade de cada resposta pode ser explicada pelas variáveis envolvidas nos processos de extração. Assim, todos os modelos foram estatisticamente adequados e, portanto, utilizados para “navegar” o desenho experimental na etapa de otimização. Apesar dos coeficientes do modelo serem empíricos e não refletirem significância física ou química, estes são úteis para prever o resultado de condições experimentais não testadas (Pinela et al., 2018).

Algumas particularidades relacionadas com os efeitos das variáveis independentes na extração de antocianinas a partir da framboesa vermelha podem ser inferidas a partir da complexidade das equações polinomiais construídas para os processos EAT e EAU. No primeiro método, as variáveis  $T$  e  $t$  afetaram significativamente o rendimento da extração através de efeitos lineares negativos e quadráticos positivos, respetivamente, o qual também foi afetado pela interação negativa de  $S$  com as variáveis  $T$  e  $t$ . Para as antocianinas, a extração foi fortemente afetada por interações entre as três variáveis, principalmente  $t \times S$  e  $t \times T$  (as quais foram negativas). No método EAU, a variável  $P$  induziu efeitos significativos (lineares positivos e quadráticos negativos) no rendimento de extração; a variável  $S$  também induziu um efeito quadrático negativo e interagiu negativamente com a variável  $P$ .

Conforme traduzido pelas equações polinomiais de ambos os processos, a tendência de extração de antocianinas foi mais complexa quando os ultrassons foram usados como fator de intensificação; este processo (EAU) foi afetado principalmente pelos efeitos lineares de  $P$  e  $S$  e pelas interações  $t \times P$  e  $t \times S$ , bem como  $t \times P^2$ . Estes resultados justificam o uso da ferramenta de otimização RSM, uma vez que as abordagens de *one-factor-at-a-time* não permitem avaliar efeitos interativos, o que dificulta a determinação de condições ótimas de processamento.

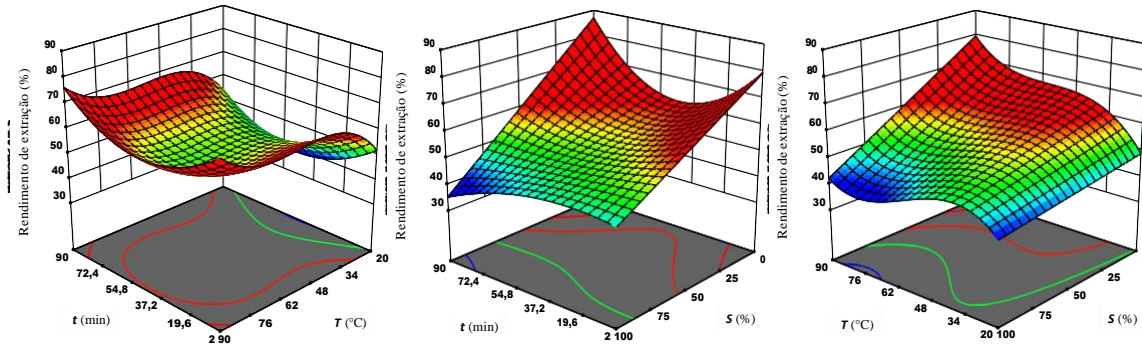
### 5.3. Efeito dos parâmetros de extração no conteúdo de antocianina

Os gráficos de superfície de resposta gerados para ilustrar o efeito das variáveis independentes sobre o rendimento de extração e teores de antocianinas obtidos com os métodos EAT e EAU são apresentados nas **Figuras 7 e 8**, respectivamente. Em cada um dos gráficos 3D, a variável independente não representada foi posicionada no seu valor ótimo individual apresentado na **Tabela 5** (para EAT) ou na **Tabela 6** (para EAU).

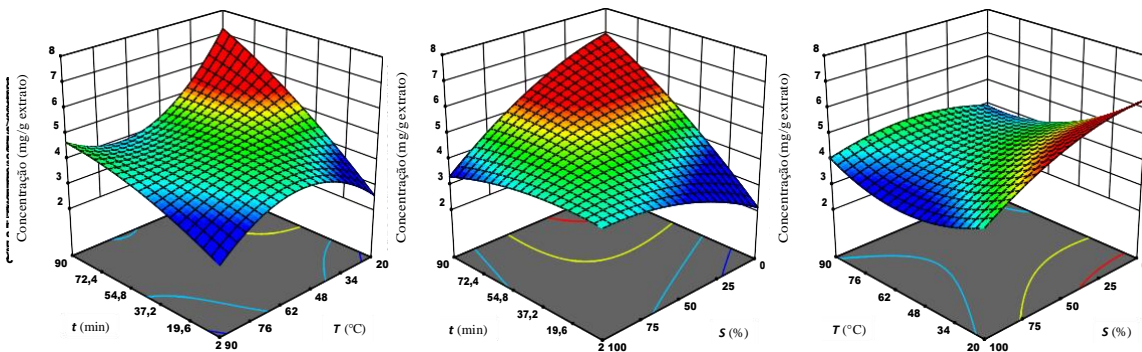
#### 5.3.1. Extração assistida por temperatura

O rendimento de extração foi significativamente influenciado pela temperatura usada no método EAT (**Tabela 4**); o aumento de  $T$  provocou um aumento na massa de extrato obtida, principalmente quando aumentada de aproximadamente 20 para 35 °C e de 75 para 90 °C (**Figura 7**). Esta variável interagiu negativamente com o solvente, resultando em massas de extrato maiores quando utilizadas temperaturas mais altas e menores proporções de etanol. Por sua vez, a interação negativa entre  $S$  e  $t$  foi responsável pelos maiores rendimentos obtidos com tempos de processamento mais longos e menores proporções de etanol. Portanto, o processamento das amostras de framboesa a 85 °C durante 77 min, com 29% (v/v) de etanol, permitiu maximizar o rendimento de extração para 65% (**Tabela 5**).

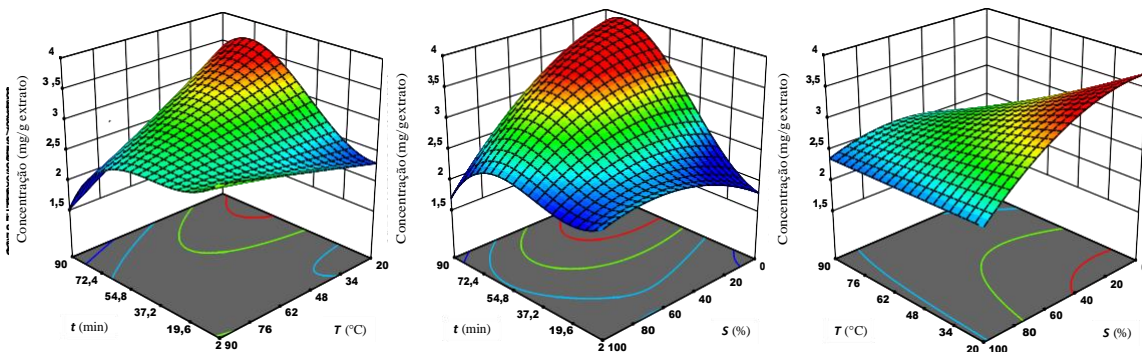
### Rendimento de extração



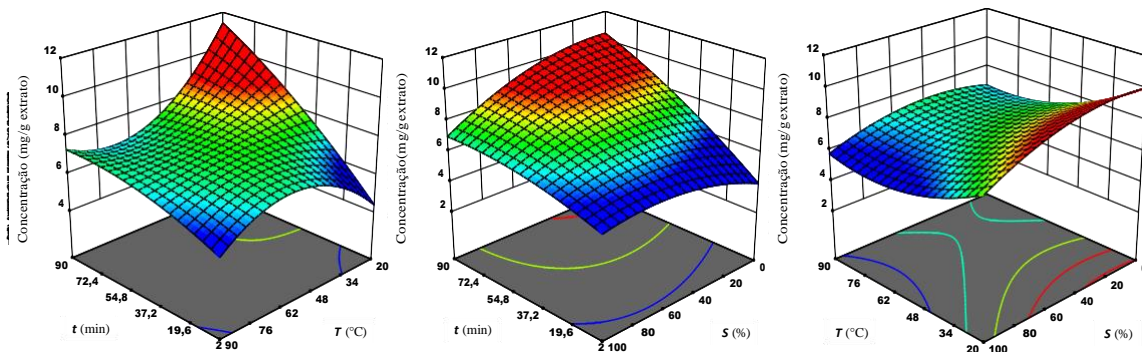
### Cianidina-3-*O*-soforósido



### Cianidina-3-*O*-glucósido



### Total de antocianinas



**Figura 7.** Gráficos de superfície de resposta para os efeitos do tempo de extração ( $t$ ), temperatura ( $T$ ) e proporção de etanol ( $S$ ) no rendimento de extração (%), teores de cianidina-3-*O*-soforósido (C3S), cianidina-3-*O*-glucósido (C3G) e totais de antocianinas (C3S + C3G) (mg/g extrato) obtidos a partir de framboesa vermelha pelo processo EAT.

**Tabela 5.** Condições ótimas de processamento que maximizam a extração EAT de antocianinas a partir de framboesa vermelha e respostas previstas pelo modelo e obtidas experimentalmente.

|  | Condições ótimas de extração EAT |               |                  | Valor ótimo    |                |
|--|----------------------------------|---------------|------------------|----------------|----------------|
|  | <i>t</i> (min)                   | <i>T</i> (°C) | <i>S</i> (% v/v) | Previsto       | Experimental   |
| <i>Para cada uma das variáveis de resposta</i> |                                  |               |                  |                |                |
| <b>η</b>                                       | 76.64                            | 84.73         | 28.93            | 65±2%          | -              |
| <b>C3S</b>                                     | 64.66                            | 27.01         | 29.17            | 5.71±0.09 mg/g | -              |
| <b>C3G</b>                                     | 63.11                            | 20.70         | 34.65            | 3.59±0.04 mg/g | -              |
| <b>Total</b>                                   | 67.65                            | 27.79         | 36.60            | 9.2±0.1 mg/g   | -              |
| <i>Para todas as variáveis de resposta</i>     |                                  |               |                  |                |                |
| <b>η</b>                                       |                                  |               |                  | 61±2%          | 62±2%          |
| <b>C3S</b>                                     |                                  |               |                  | 5.29±0.08 mg/g | 5.3±0.2 mg/g   |
| <b>C3G</b>                                     | 75.70                            | 38.09         | 21.40            | 3.39±0.04 mg/g | 3.26±0.06 mg/g |
| <b>Total</b>                                   |                                  |               |                  | 8.7±0.1 mg/g   | 8.5±0.2 mg/g   |

*t*: tempo; *T*: temperatura; *S*: solvente (percentagem de etanol); η: rendimento de extração; C3S: cianidina-3-*O*-soforósido; C3G: cianidina-3-*O*-glucósido; Total: C3S + C3G.

As três variáveis independentes (*t*, *T* e *S*) do processo EAT também afetaram a recuperação das antocianinas a partir da framboesa. As tendências de extração foram semelhantes para a C3S e a C3G e, portanto, para a soma de ambas as antocianinas. De um modo geral, a extração foi promovida por tempos de processamento mais longos e temperaturas e proporções de etanol mais baixas (**Figura 7**). Temperaturas mais altas parecem causar a degradação destes pigmentos termossensíveis, enquanto que tempos de extração reduzidos não foram suficientes para promover a extração. De facto, é interessante destacar as interações negativas de *t* com *T* e *S* (**Tabela 4**), pois evidenciam que, para tempos de extração mais longos, é preferível aplicar baixas temperaturas e menores proporções de etanol. Para a C3G, as concentrações mais baixas foram obtidas quando se utilizaram tempos acima de 70 min e altas proporções de etanol. Além dos efeitos nefastos da temperatura, uma proporção baixa de etanol foi essencial para promover a extração das antocianinas. Também foi interessante notar que, ao processar as amostras por pouco mais de 2 min, o aumento da temperatura potencializou a extração do total de antocianinas até um certo nível, mas depois foi diminuindo com o aumento da temperatura. Desta forma, para atingir o máximo de 9,2 mg/g de extrato, foi necessário processar a framboesa vermelha a 28 °C durante 68 min, utilizando etanol a 37% (v/v) (**Tabela 5**). Ao comparar estas condições com as previstas para o rendimento de extração, é possível concluir que são extraídos outros compostos além das antocianinas (provavelmente açúcares) ao aplicar altas temperaturas. Esse resultado

evidencia de alguma forma que há seletividade para antocianinas em função da temperatura aplicada.

Conforme mencionado anteriormente, as tendências de extração são afetadas pelas características físicas, composicionais e estruturais da matéria-prima de onde se pretende extrair as antocianinas, o que justifica as diferentes condições de processamento que têm sido descritas na literatura. As condições ótimas de EAT descritas por Ghada et al. (2020) para a extração de C3G a partir de epicarpis de maracujá (78 min de agitação a 20 °C, usando etanol 29%, v/v) são próximos aos obtidos no presente estudo e renderam 12±2 mg/g de extrato. Backes et al. (2018) relataram uma temperatura (~28 °C) semelhante à necessária para processar a amostra de framboesa vermelha, um tempo de extração menor (apenas 14 min) e etanol a 100% como sendo as melhores condições para recuperar cianidina-3-*O*-rutinosídeo a partir de cascas de figo, com um rendimento de 6,0±0,6 mg/g de extrato, um valor inferior ao obtido com a framboesa vermelha. No estudo de Pinela et al. (2019), os autores otimizaram o processo EAT para extração de delphinidina-3-*O*-sambubiósido + cianidina-3-*O*-sambubiósido a partir de cálices vermelhos de hibiscos (*Hibiscus sabdariffa* L.) e descreveram, como condições ótimas, 30 min de processamento a 30 °C, usando água como solvente de extração, originando 21±1 mg/g de extrato. Com o método EAT, Albuquerque et al. (2020) conseguiram obter 81±2 mg de delphinidina-3-*O*-glucósido + C3G por grama de extrato, ao processar uma amostra de epicarpo de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg.) a 47 °C durante 22 min com 9% (v/v) de etanol. Todos os trabalhos de otimização mencionados acima descreveram a utilização de temperaturas baixas, pois as antocianinas podem sofrer degradação durante o processamento térmico, o que pode afetar a sua tonalidade de cor. No entanto, López et al. (2018) concluíram que as antocianinas detetadas no medronho (onde a C3G foi identificada como pigmento maioritário) são mais bem extraídas com processamento a 90 °C durante 5 min, com 80% (v/v) de etanol.

### 5.3.2. Extração assistida por ultrassons

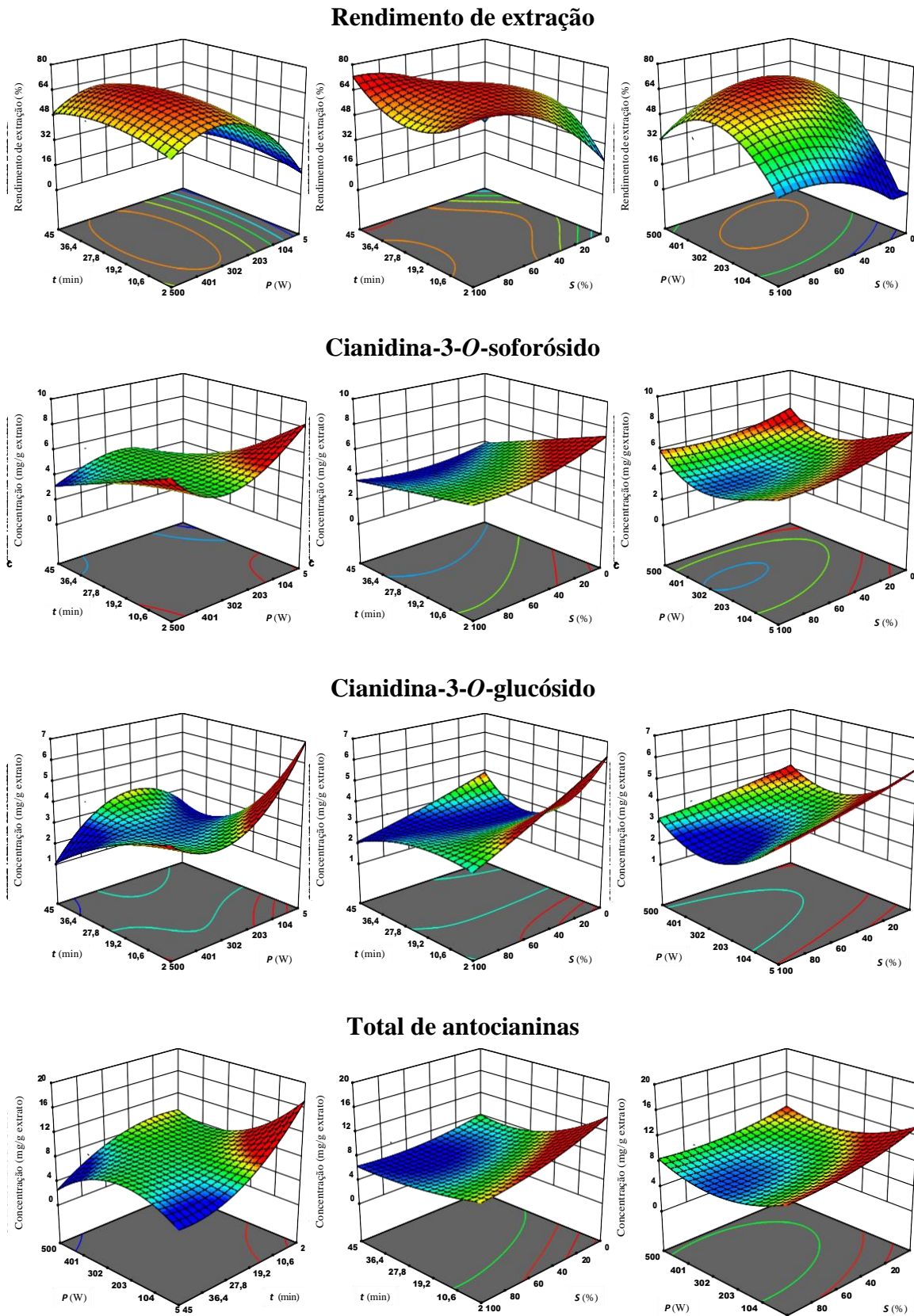
No método EAU, a potência ultrassônica foi a variável que mais afetou o rendimento de extração, seguida do solvente (**Equação 9** e **Tabela 4**). Os efeitos da variável *P* são ilustrados na **Figura 8**, onde a curvatura das superfícies de resposta e suas projeções mostram perfeitamente que os níveis de potência média-alta são os intervalos de processamento ótimos. Também foi possível verificar que os níveis intermédios de

tempo e solvente foram favoráveis. Em geral, enquanto as gamas mais baixas das variáveis não foram suficientes para promover a extração, os níveis mais elevados poderão ter levado à degradação dos compostos. A sonicação das amostras a 337 W durante 25 min, usando 51% (v/v) de etanol como solvente de extração, foram as condições que maximizaram o rendimento de extração para 66% (**Tabela 6**). A extração, de ambas as antocianinas, foi favorecida por condições médio-baixas das três variáveis do desenho DCCR (**Figura 8**). Para tempos de extração mais longos, observou-se a degradação das antocianinas quando aplicando uma maior potência ultrassônica; enquanto que, por outro lado, a menor potência aplicada não foi suficiente para promover a sua extração. Como se pode observar nos modelos polinomiais desenvolvidos (**Equações 10–12**), as interações observadas foram todas positivas e traduziram um aumento no valor da resposta com a consequente diminuição dos valores de ambas as variáveis independentes representadas nos gráficos 3D. O modelo (**Equação 12**) previu que 10,1 mg/g de ambas as antocianinas podem ser recuperadas quando processando o material vegetal a 100 W durante 11 min, usando 19% (v/v) de etanol, sendo estas as condições EAU ótimas (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Condições ótimas de processamento que maximizam a extração EAU de antocianinas a partir de framboesa vermelha e respostas previstas pelo modelo e obtidas experimentalmente.

|  | Condições ótimas de extração EAU |              |                  | Valor ótimo    |                |
|--|----------------------------------|--------------|------------------|----------------|----------------|
|  | <i>t</i> (min)                   | <i>P</i> (W) | <i>S</i> (% v/v) | Previsto       | Experimental   |
| <i>Para cada uma das variáveis de resposta</i> |                                  |              |                  |                |                |
| <b>η</b>                                       | 25.20                            | 336.58       | 50.72            | 66±2%          | -              |
| <b>C3S</b>                                     | 10.70                            | 115.80       | 18.40            | 5.98±0.09 mg/g | -              |
| <b>C3G</b>                                     | 9.38                             | 98.30        | 30.45            | 4.00±0.05 mg/g | -              |
| <b>Total</b>                                   | 11.11                            | 99.90        | 19.08            | 10.1±0.1 mg/g  | -              |
| <i>Para todas as variáveis de resposta</i>     |                                  |              |                  |                |                |
| <b>η</b>                                       |                                  |              |                  | 58±3%          | 58±3%          |
| <b>C3S</b>                                     | 15.61                            | 465.90       | 37.58            | 5.03±0.09 mg/g | 5.04±0.08 mg/g |
| <b>C3G</b>                                     |                                  |              |                  | 3.30±0.05 mg/g | 3.31±0.08 mg/g |
| <b>Total</b>                                   |                                  |              |                  | 8.3±0.1 mg/g   | 8.3±0.2 mg/g   |

*t*: tempo; *P*: potência ultrassônica; *S*: solvente (percentagem de etanol); η: rendimento de extração; C3S: cianidina-3-*O*-soforósido; C3G: cianidina-3-*O*-glucósido; Total: C3S + C3G.



**Figura 8.** Gráficos de superfície de resposta para os efeitos do tempo de extração ( $t$ ), potência ultrassônica ( $P$ ) e proporção de etanol ( $S$ ) no rendimento de extração (%  $m/m$ ) e teores de cianidina-3- $O$ -soforósido (C3S), cianidina-3- $O$ -glucósido (C3G) e totais de antocianinas (C3S + C3G) (mg/g extrato) obtidos a partir de framboesa vermelha pelo processo EAU.

A extração EAU de antocianinas de framboesa vermelha (cultivar 'Heritage') foi previamente otimizado por Chen et al. (2007). O tempo de extração (6,2–302 min), a potência ultrassônica (232–568 W; na frequência de 22 kHz) e a razão sólido/líquido (0,6–7,4 g/mL) foram as variáveis independentes incluídas no desenho experimental, enquanto o solvente consistiu em 95% (v/v) de etanol acidificado com HCl a 1,5 M em todas as extrações. A partir de 100 g de amostra fresca, foi possível recuperar 34,5 mg de antocianinas ao processar a amostra a 400 W durante 3,3 min, com uma razão sólido/líquido de 4:1 (g/mL). Em comparação com um método convencional que rendeu 35,1 mg de antocianinas na extração a 71 °C durante 53 min, o método EAU permitiu economizar tempo e solvente devido à sua capacidade de romper os tecidos vegetais através de fenômenos de cavitação acústica. Os autores também concluíram que EAU não causou uma degradação perceptível de antocianinas devido ao baixo tempo de extração necessário, que foi ainda menor do que o ótimo alcançado no presente estudo.

Relativamente a estudos com outras matrizes vegetais, foram previstos tempos de processamento (21 e 26 min) e proporções de etanol (100 e 39%, v/v) maiores para a recuperação de antocianinas de cascas de figo (Backes et al., 2018) e cálices de hibiscos (Pinela et al., 2019), respetivamente, enquanto a potência ultrassônica foi em torno de 300 W em ambos os casos, tendo rendido  $9,6 \pm 0,5$  e  $21 \pm 1$  mg/g, respetivamente.

O uso de MAE também foi investigado para a extração de antocianinas a partir de framboesa vermelha. Ao irradiar a amostra a 366 W durante 12 min a uma razão sólido/líquido de 4:1 (g/mL), Sun et al. (2007) alcançou 43,42 mg/100 g de amostra fresca, teor superior aos 34,5 mg/100 g descritos por Chen et al. (2007) usando um processo otimizado de EAU. O protocolo MAE desenvolvido foi mais rápido e eficiente do que um método convencional testado devido à forte capacidade de a irradiação micro-ondas romper a estrutura do tecido vegetal e aumentar a transferência de massa. Backes et al. (2018) compararam três métodos de extração e, com base nos rendimentos de extração obtido para as antocianinas da casca de figo, classificaram os métodos da seguinte forma: EAU ( $9,0 \pm 0,8$  mg/g de extrato), MAE ( $7,4 \pm 0,8$  mg/g de extrato) e EAT ( $5,8 \pm 0,1$  mg/g de extrato).

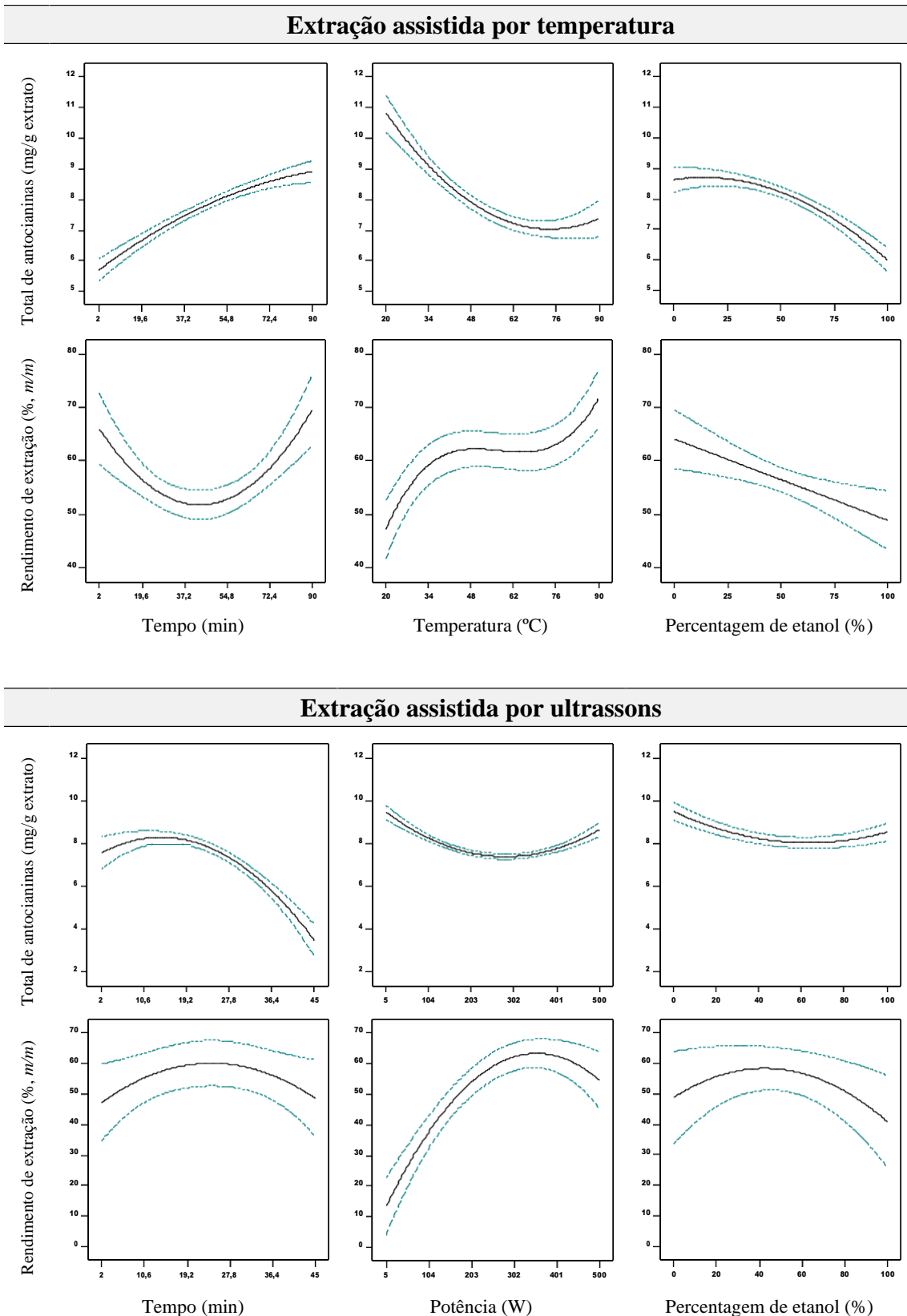
### ***5.3.3. Processamento por EAT versus EAU***

Os dois métodos de extração testados neste estudo foram comparados a fim de concluir qual seria o mais adequado para produzir extratos de framboesa vermelha com teores mais elevados de antocianinas. As **Tabela 5** e **6** apresentam as condições ótimas de

processamento que maximizam o rendimento de extração e o teor total de antocianinas tanto quanto possível. A otimização foi realizada porque é importante para a indústria obter uma grande quantidade de extrato e também uma elevada concentração de compostos alvo a partir de uma determinada matriz. A **Figura 9** mostra as respostas 2D individuais de cada variável independente envolvida nas extrações quando todas as variáveis de resposta são maximizadas simultaneamente.

Embora o método EAU tenha originado respostas experimentais mais elevadas quando as variáveis dependentes foram maximizadas individualmente (**Tabela 6**), o EAT pareceu ser mais adequado para maximizar as variáveis de resposta em simultâneo (**Tabela 5**). Como pode ser observado nas **Figuras 7, 8 e 9**, as condições ótimas de extração globais estão mais próximas das individuais no método EAT, uma vez que as tendências observadas para o rendimento de extração e as antocianinas totais foram mais próximas, o que justifica o melhor desempenho deste método para ambas as respostas. No método EAT, tempos de extração mais longos (76 min) e proporções médio-baixas de etanol (21%, v/v) favoreceram ambas as respostas, enquanto que temperaturas baixas (28 °C) foram adequadas para antocianinas e superiores (85 °C) para a massa de extrato ou resíduo (**Figura 9**). Por outro lado, as tendências de extração foram mais divergentes para o método EAU, principalmente para as variáveis potência ultrassônica e solvente. Enquanto as condições de extração individuais para o total de antocianinas e para a massa de extrato foram promovidas pela utilização de 100 e 337 W e de 19 e 51% (v/v) de etanol, respetivamente, as condições ótimas globais foram promovidas pelo processamento das amostras a 466 W durante 16 min, usando 38% (v/v) de etanol (**Tabela 6**).

O método EAU permitiu economizar no tempo de extração ao processar a 466 W, provavelmente devido à capacidade de as ondas ultrassônicas rebentarem as paredes celulares da amostra de framboesa vermelha, facilitando a penetração do solvente e a consequente recuperação dos solutos. Embora o método EAT tenha exigido um tempo de processamento muito maior (76 min), a temperatura necessária não foi muito alta (38 °C) e a percentagem de solvente foi ligeiramente inferior à exigida para o método EAU. Para se poder concluir qual é o método mais sustentável, será necessário e interessante calcular os custos energéticos associados a cada um deles. No entanto, as indústrias interessadas nos processos desenvolvidos poderão optar pela metodologia que melhor se adapta às suas instalações e aos equipamentos que já possuem. Ainda assim, como este é um estudo à escala de bancada, terão de ser implantadas etapas posteriores *scale-up*.



**Figura 9.** Gráficos de resposta 2D para os efeitos das variáveis independentes no rendimento de extração (%  $m/m$ ) e teor de antocianinas totais (mg/g de extrato) obtidos a partir da framboesa vermelha por EAT e EAU ao maximizar simultaneamente todas as respostas. Em cada gráfico, as variáveis excluídas foram posicionadas no seu valor ótimo global (**Tabelas 5 e 6**).

A adequação dos métodos EAT e EAU para a extração de antocianinas a partir de diferentes materiais vegetais já foi objeto de estudos anteriores. López et al. (2018) verificaram que as antocianinas detetadas no medronho também são melhor extraídas por EAT do que por EAU, num processo que rende 51% de massa de extrato com um teor total de antocianinas de 745 µg/g de extrato, quando extraído a 90 °C durante 5 min com 80% (v/v) de etanol. No entanto, estas condições são bem diferentes daquelas alcançadas no presente estudo, onde as temperaturas mais elevadas afetaram a integridade das antocianinas da framboesa vermelha. O método EAT (22 min de processamento a 47 °C com 9% (v/v) de etanol) também foi descrito como sendo mais eficiente do que o EAU (24 min de sonicação a 500 W com etanol a 34%) para recuperar antocianinas de epicarpo de jabuticaba, em processos que renderam 81±2 e 31±2 mg/g de extrato, respetivamente (Albuquerque et al., 2020). Por outro lado, também há estudos descrevendo que o método EAU é mais adequado para a extração de antocianinas. Pinela et al. (2019) concluíram que o método EAU é mais adequado do que o EAT para recuperar delfinidina-3-*O*-sambubiósido + cianidina-3-*O*-sambubiosósido a partir de cálices de hibiscos, num processo que rendeu 61±6% de massa de extrato e 48±4 mg de antocianinas por grama de extrato, quando processando sob condições ótimas (43 min de sonicação a 386 W, com etanol a 46%). O método EAU também foi apontado como sendo mais eficaz do que o EAT ou o MAE para recuperar cianidina 3-rutinósido da casca de figo (Backes et al., 2018). É possível concluir que as condições de extração são afetadas pela complexidade composicional e estrutural do material vegetal e que a antocianidina e a molécula de açúcar da antocianina também podem ser características estruturais relevantes.

#### 5.4. Validação experimental dos modelos


As condições globais de processamento que maximizam o rendimento de extração e a extração de antocianinas a partir da framboesa vermelha pelos métodos EAT (76 min, 38 °C e 20% (v/v) de etanol; **Tabela 5**) e EAU (16 min, 466 W e 38% (v/v) de etanol; **Tabela 6**) foram testados experimentalmente para avaliar a capacidade de previsão dos modelos desenvolvidos e para obter extratos ricos em antocianinas para avaliação da capacidade corante e de propriedades bioativas. Conforme apresentado nas **Tabelas 5 e 6**, os métodos EAT e EAU renderam 62±2% e 58 ± 3% de massa de extrato, valores que não diferiram dos 61±2% e 58±3% previstos pelos modelos, respetivamente. A extração EAT resultou em 5,3±0,2 mg de C3S e em 3,26±0,06 mg de C3G por cada grama de

extrato, totalizando  $8,5\pm 0,2$  mg de antocianinas. Por sua vez, cada grama de extrato obtido com o processo EAU apresentou  $5,04\pm 0,08$  mg de C3S e  $3,31\pm 0,08$  mg de C3G, totalizando assim  $8,3\pm 0,2$  mg de antocianinas. A capacidade preditiva dos modelos foi assim validada experimentalmente, uma vez que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre os valores experimentais e previstos pelo modelo ao aplicar um teste *t* de Student.

### 5.5. Propriedades corantes e bioativas dos extratos

As antocianinas estão entre os corantes alimentares de origem natural mais importantes e amplamente utilizados. As antocianinas comerciais, como a cianidina-3-glicósido, a pelargonidina-3-glicósido e a peonidina-3-glicósido têm sido amplamente estudadas e utilizadas, uma vez que a sua cor e estabilidade são afetadas por vários fatores externos como o pH, a temperatura e a humidade, entre outros (Martins et al., 2016). Portanto, a cor das antocianinas varia em função destes fatores. Os parâmetros de cor registados na amostra de framboesa vermelha liofilizada e reduzida a pó e nos dois extratos obtidos aplicando as condições otimizadas de EAT e EAU são apresentados na **Tabela 7**.

**Tabela 7.** Parâmetros de cor do pó liofilizado de framboesa vermelha e dos extratos obtidos nas condições otimizadas de EAT e EAU.

|                       | <i>L*</i> : luminosidade | <i>a*</i> : tom vermelho | <i>b*</i> : tom amarelo | Cor RGB   |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|---|
| <b>Pó liofilizado</b> | $37.2\pm 0.8^a$          | $37.3\pm 0.4^a$          | $10.1\pm 0.1^c$         |  |
| <b>Extrato EAT</b>    | $35.8\pm 0.9^b$          | $36\pm 1^b$              | $15.1\pm 0.8^b$         |   |
| <b>Extrato EAU</b>    | $35.8\pm 0.9^b$          | $36\pm 1^b$              | $16.1\pm 0.9^a$         |   |

Em cada coluna, letras diferentes correspondem a diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Os extratos apresentaram uma tonalidade mais escura (valores de *L\** mais baixos) e uma tonalidade de vermelho menos intensa (valores de *a\** mais baixos) do que a amostra de liofilizada framboesa ( $p < 0.05$ ). Por outro lado, foram registados valores de *b\** mais elevados nos extratos, principalmente no obtido por EAU, do que no pó de framboesa. No entanto, conforme mostrado na **Tabela 7**, a cor dos dois extratos era difícil de distinguir a olho nu. Além disso, foi interessante concluir que a cor vermelho-púrpura da framboesa vermelha foi de alguma forma preservada com os processos de extração estudados.

A conservação de géneros alimentícios durante as etapas de processamento e armazenamento é um grande desafio no setor alimentar e pode ser conseguida pela

adição de ingredientes naturais com atividade antioxidante e antimicrobiana aos alimentos. Os extratos ricos em antocianinas são cada vez mais utilizados como ingredientes alimentares e reconhecidos principalmente pela sua capacidade corante e pela ampla gama de propriedades bioativas e efeitos promotores da saúde (Martins et al., 2016).

A **Tabela 8** apresenta os resultados da atividade antioxidante dos dois extratos de framboesa vermelha obtidos nas condições otimizadas de extração. O extrato obtido por EAT apresentou uma maior atividade antioxidante (capacidade de inibir a peroxidação lipídica e a ação hemolítica do oxidante AAPH) do que o extrato obtido por EAU, o que pode ser justificado pelo maior teor de antocianinas do extrato EAT. O padrão comercial trolox, usado como controlo positivo, apresentou um valor muito inferior ao dos extratos (i.e., maior atividade antioxidante); no entanto, o trolox é um composto puro, enquanto os extratos são misturas complexas de vários compostos (e.g., polifenóis, vitaminas, hidratos de carbono, etc.), alguns dos quais não apresentam efeitos antioxidantes.

**Tabela 8.** Atividade antioxidante dos extratos de framboesa vermelha obtidos nas condições otimizadas de EAT e EAU e do controlo positivo.

|                                   | Extratos de framboesa |                     | Controlo positivo     |
|-----------------------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
|                                   | Obtido por EAT        | Obtido por EAU      | Trolox                |
| TBARS (EC <sub>50</sub> , µg/mL)  | 28±1 <sup>b</sup>     | 48±1 <sup>a</sup>   | 5.4±0.3 <sup>c</sup>  |
| OxHLIA (IC <sub>50</sub> , µg/mL) | 449±14 <sup>b</sup>   | 520±23 <sup>a</sup> | 21.8±0.6 <sup>c</sup> |

Em cada linha, letras diferentes correspondem a diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

No ensaio TBARS, foi obtido um valor de EC<sub>50</sub> de 28 µg/mL com o extrato EAT (**Tabela 8**), sendo por isso mais eficaz do que o extrato obtido por EAU na prevenção da formação de substâncias reativas, como o malondialdeído que resulta da oxidação dos ácidos gordos polinsaturados das membranas das células do cérebro de porco utilizadas como substrato, o que indica que é mais eficaz em retardar os fenómenos de oxidação lipídica associados à deterioração de alimentos. Entre a gama de concentrações de extrato testadas, as mais baixas não foram capazes de prevenir a formação dos TBARS que reagiram com o ácido tiobarbitúrico, adicionado à mistura antes da incubação a 80 °C para formar complexos cor de rosa que absorvem a um comprimento de onda de 532 nm.

No OxHLIA, foi necessária uma concentração de extrato EAT de 449  $\mu\text{g/mL}$  para proteger metade da população de eritrócitos da hemólise oxidativa durante um  $\Delta t$  de 60 min, enquanto que foram necessários 520  $\mu\text{g/mL}$  do extrato obtido por EAU (**Tabela 8**). Neste ensaio, o AAPH, um iniciador de radicais livres dependente da temperatura, foi responsável pela formação de radicais peróxido no sistema *in vitro* que, numa fase inicial, atacaram as membranas dos eritrócitos e eventualmente levaram à sua hemólise. De seguida, foram gerados radicais lipofílicos como consequência da reação de peroxidação lipídica inicial, os quais também contribuíram para a hemólise destas células sanguíneas. É importante referir que este ensaio é adequado para avaliar a atividade antioxidante de extratos naturais, pois utiliza os radicais peróxido que são fisiologicamente relevantes, mimetizando os radicais peróxido envolvidos nas reações de peroxidação lipídica *in vivo* (Tai et al., 2012).

A atividade antioxidante da framboesa vermelha tem sido medida *in vitro* principalmente por ensaios de base química, quanto à capacidade de eliminação de radicais DPPH e ABTS e poder redutor (pelos métodos FRAP e CUPRAC) e alguns métodos bioquímicos, como a capacidade de inibir a descoloração do  $\beta$ -caroteno (De Souza et al., 2014; Milivojević et al., 2011; Sariburun et al., 2010; Valdés García et al., 2020). Os extratos de framboesa já foram descritos como sendo mais antioxidantes do que os obtidos a partir de mirtilo, nos quais foram detetados teores mais baixos de antocianinas (De Souza et al., 2014). Gião et al. (2010) também verificaram que o extrato aquoso de framboesa tem capacidade de proteger eritrócitos humanos da hemólise induzida por peróxido de hidrogénio. Num estudo *in vivo*, foi observada uma diminuição de biomarcadores de estresse oxidativo em ratos diabéticos obesos alimentados com framboesa liofilizada durante 8 semanas em dietas isocalóricas (5,3% de framboesa (*m/m*) ou controlo) (Noratto et al., 2017). O aumento das defesas celulares desintoxicantes exercidas pela ingestão da framboesa foi associado aos polifenóis e à fibra alimentar.

Os extratos de framboesa produzidos em condições ótimas de extração também foram testados contra microrganismos transmitidos por alimentos, incluindo bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*) e Gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* e MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina). Conforme apresentado na **Tabela 9**, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* foram as bactérias mais sensíveis aos extratos testados e, de um modo geral, o

extrato obtido por EAU foi mais eficaz contra *Escherichia coli*, *Morganella morganii* e MRSA. No entanto, a concentração mínima necessária para inibir a maioria das estirpes testadas foi a mesma para ambos os extratos. Por outro lado, foi necessária uma concentração de extrato superior a 20 mg/mL para se alcançar um efeito bactericida. Portanto, a utilização de extratos de framboesa vermelha ricos em antocianinas como ingredientes alimentares pode ser útil para retardar o crescimento microbiano e, assim, ajudar a prevenir processos de deterioração e a ocorrência de possíveis contaminações causadas por alimentos. O potencial antibacteriano de extratos hidroetanólicos de framboesas vermelhas e pretas foi previamente avaliado contra bactérias patogênicas humanas comuns, entre as quais as mais sensíveis aos extratos foram *Corynebacterium diphtheriae* e *Moraxella catarrhalis* (Krauze-Baranowska et al., 2014).

**Tabela 9.** Atividade antibacteriana dos extratos de framboesa vermelha obtidos nas condições ótimas de EAT e EAU e dos controlos positivos.

|                               | Extratos de framboesa |     |                |     | Controlos positivos |       |          |         |             |         |
|-------------------------------|-----------------------|-----|----------------|-----|---------------------|-------|----------|---------|-------------|---------|
|                               | Obtido por EAT        |     | Obtido por EAU |     | Ampicilina          |       | Imipenem |         | Vancomicina |         |
|                               | MIC                   | MBC | MIC            | MBC | MIC                 | MBC   | MIC      | MBC     | MIC         | MBC     |
| <i>Escherichia coli</i>       | 5                     | >20 | 2.5            | >20 | <0.15               | <0.15 | <0.0078  | <0.0078 | n.t.        | n.t.    |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>  | >20                   | >20 | >20            | >20 | 10                  | 20    | <0.0078  | <0.0078 | n.t.        | n.t.    |
| <i>Morganella morganii</i>    | 10                    | >20 | 5              | >20 | 20                  | >20   | <0.0078  | <0.0078 | n.t.        | n.t.    |
| <i>Proteus mirabilis</i>      | 20                    | >20 | 20             | >20 | <0.15               | <0.15 | <0.0078  | <0.0078 | n.t.        | n.t.    |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 10                    | >20 | 10             | >20 | >20                 | >20   | 0.5      | 1       | n.t.        | n.t.    |
| <i>Enterococcus faecalis</i>  | 2.5                   | >20 | 2.5            | >20 | <0.15               | <0.15 | n.t.     | n.t.    | <0.0078     | <0.0078 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 20                    | >20 | 20             | >20 | <0.15               | <0.15 | <0.0078  | <0.0078 | n.t.        | n.t.    |
| MRSA                          | 10                    | >20 | 5              | >20 | <0.15               | <0.15 | n.t.     | n.t.    | 0.25        | 0.5     |

MIC: concentração mínima inibitória (mg/mL); MBC: concentração mínima bactericida (mg/mL); MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; n.t.: não testado.



## 6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Este trabalho de investigação demonstrou a adequação de dois métodos de extração intensificados por temperatura (EAT) e ultrassons (EAU) para a extração de antocianinas (glicósidos de cianidina) a partir de framboesa vermelha. As três variáveis independentes (tempo, percentagem de etanol e temperatura ou potência ultrassónica) utilizadas nos processos de otimização induziram efeitos significativos e a existência de interações entre elas justificou o uso da metodologia RSM. De um modo geral, o método EAT originou valores globais de resposta ligeiramente mais elevados, mas exigiu um tempo de processamento mais longo do que o método EAU (76 e 16 min, respetivamente). Em termos de energia, foram necessários 38 °C (no método EAT) ou 466 W de potência (no método EAU) para maximizar simultaneamente as variáveis dependentes massa de extrato e concentração de antocianinas.

Após validação estatística e experimental dos modelos teóricos preditivos, foram medidos os parâmetros de cor e a atividade antioxidante e antibacteriana dos dois extratos de framboesa vermelha obtidos sob as condições ótimas de processamento previstas para cada um dos métodos de extração. Embora a cor do extrato obtido por EAT fosse ligeiramente mais próxima à cor do pó liofilizado de framboesa, a olho nu não se notou nenhuma diferença acentuada entre os dois extratos. O extrato obtido por EAT também foi mais antioxidante *in vitro* devido à menor concentração de extrato necessária para inibir a formação de TBARS e proteger da hemólise oxidativa. Também foram registados efeitos antibacterianos, principalmente contra *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*.

Os resultados obtidos no âmbito deste trabalho poderão ser explorados pelo setor industrial interessado na produção de corantes naturais bioativos ricos em antocianinas. Em estudos futuros, será interessante investigar a estabilidade dos extratos antociânicos obtidos neste trabalho, quando expostos a diferentes fatores (incluindo diferentes gamas de pH, temperatura e humidade relativa) e também em matrizes alimentares reais (com diferentes atributos físico-químicos e necessidade de processamento). Também será interessante explorar técnicas de estabilização da cor das antocianinas por copigmentação e a produção de pós corantes de framboesa vermelha pelo método de *spray drying*.



**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Albuquerque, B.R., Pinela, J., Barros, L., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, I.C.F.R., 2020. Anthocyanin-rich extract of jabuticaba epicarp as a natural colorant: Optimization of heat- and ultrasound-assisted extractions and application in a bakery product. *Food Chem.* 316, 126364.
- Albuquerque, B.R., Prieto, M.A., Vazquez, J.A., Barreiro, M.F., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., 2018. Recovery of bioactive compounds from *Arbutus unedo* L. fruits: Comparative optimization study of maceration/microwave/ultrasound extraction techniques. *Food Res. Int.* 109, 455–471.
- Amchova, P., Kotolova, H., Ruda-Kucerova, J., 2015. Health safety issues of synthetic food colorants. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 73, 914–922.
- Anjos, R., Cosme, F., Gonçalves, A., Nunes, F.M., Vilela, A., Pinto, T., 2020. Effect of agricultural practices, conventional vs organic, on the phytochemical composition of ‘Kweli’ and ‘Tulameen’ raspberries (*Rubus idaeus* L.). *Food Chem.* 328, 126833.
- Backes, E., Pereira, C., Barros, L., Prieto, M.A., Genena, A., Barreiro, M.F., Ferreira, I.C.F.R., 2018. Recovery of bioactive anthocyanin pigments from *Ficus carica* L. peel by heat, microwave, and ultrasound based extraction techniques. *Food Res. Int.* 113, 197–209.
- Barrett, J.R., 2007. Diet & nutrition: hyperactive ingredients? *Environ. Health Perspect.* 115 (12), 115-578.
- Beekwilder, J., Jonker, H., Meesters, P., Hall, R.D., Van Der Meer, I.M., De Vos, C.H.R., 2005. Antioxidants in raspberry: On-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3313–3320.
- Belwal, T., Ezzat, S.M., Rastrelli, L., Bhatt, I.D., Daglia, M., Baldi, A., Devkota, H.P., Orhan, I.E., Patra, J.K., Das, G., Anandharamakrishnan, C., Gomez-Gomez, L., Nabavi, S.F., Nabavi, S.M., Atanasov, A.G., 2018. A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 100, 82-102.
- Belwal, T., Singh, G., Jeandet, P., Pandey, A., Giri, L., Ramola, S., Bhatt, I.D., Venskutonis, P.R., Georgiev, M.I., Clément, C., Luo, Z., 2020. Anthocyanins, multi-functional natural products of industrial relevance: Recent biotechnological advances. *Biotechnol. Adv.* 43, 107600.

- Blekas, G.A., 2015. Food Additives: Classification, Uses and Regulation, in: Encyclopedia of Food and Health. Elsevier Inc., pp. 731–736.
- Boulekbache-Makhlouf, L., Medouni, L., Medouni-Adrar, S., Arkoub, L., Madani, K., 2013. Effect of solvents extraction on phenolic content and antioxidant activity of the byproduct of eggplant. *Ind. Crops Prod.* 49, 668–674.
- Boutillier, S., Fourmentin, S., Laperche, B., 2020. Food additives and the future of health: An analysis of the ongoing controversy on titanium dioxide. *Futures* 122, 102598.
- Bowen-Forbes, C.S., Zhang, Y., Nair, M.G., 2010. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *J. Food Compos. Anal.* 23, 554–560.
- Carocho, M., Barreiro, M.F., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., 2014. Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13, 377–399.
- Carocho, M., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., 2017. Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come. *Food Chem. Toxicol.* 107, 302–317.
- Carocho, M., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., 2015. Natural food additives: Quo vadis? *Trends Food Sci. Technol.* 45, 284–295.
- Chapman, S., 2011. Guidelines on approaches to the replacement of Tartrazine, Allura Red, Ponceau 4R, Quinoline Yellow, Sunset Yellow and Carmoisine in food and beverages. Food Standards Agency.
- Chappell, G.A., Britt, J.K., Borghoff, S.J., 2020. Systematic assessment of mechanistic data for FDA-certified food colors and neurodevelopmental processes. *Food Chem. Toxicol.* 140, 111310.
- Chávez-González, M.L., Sepúlveda, L., Verma, D.K., Luna-García, H.A., Rodríguez-Durán, L. V., Iliina, A., Aguilar, C.N., 2020. Conventional and emerging extraction processes of flavonoids. *Processes* 8, 434.
- Chávez-Santoscoy, R.A., Gutiérrez-Urbe, J.A., Serna-Saldivar, S.O., Perez-Carrillo, E., 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 Chem.* 192, 90–97.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S., Abert-Vian, M., 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products.

- Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.* 34, 540–560.
- Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J., Wang, Z., 2007. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Ultrason. Sonochem.* 14, 767–778.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29<sup>th</sup> ed. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
- Corradini, M.G., 2018. Synthetic food colors, in: *Encyclopedia of Food Chemistry*. Elsevier, pp. 291–296.
- Corrado, S., Sala, S., 2018. Food waste accounting along global and European food supply chains: State of the art and outlook. *Waste Manag.* 79, 120–131.
- Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., Tauscher, B., 2008. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9, 85–91.
- De Souza, V.R., Pereira, P.A.P., Da Silva, T.L.T., De Oliveira Lima, L.C., Pio, R., Queiroz, F., 2014. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chem.* 156, 362–368.
- Deng, Q., Penner, M.H., Zhao, Y., 2011. Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Res. Int.* 44, 2712–2720.
- DIRETIVA 2009/32/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Abril de 2009 relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros sobre os solventes de extracção utilizados no fabrico de géneros alimentícios e dos respectivos ingredientes (reform), 2010. *Jornal Oficial da União Europeia*.
- EFSA, 2013. Scientific Opinion on the re-evaluation of anthocyanins (E 163) as a food additive. *EFSA J.* 11, 3145.
- EUCAST, 2020. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [WWW Document]. URL <https://www.eucast.org/> (accessed 10.5.20).
- European Commission, 2019. Frequently asked questions: Reducing food waste in the EU. Brussels.

- Evans, B.C., Nelson, C.E., Yu, S.S., Beavers, K.R., Kim, A.J., Li, H., Nelson, H.M., Giorgio, T.D., Duvall, C.L., 2013. Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *J. Vis. Exp.* e50166.
- Fakhri, S., Khodamorady, M., Naseri, M., Farzaei, M.H., Khan, H., 2020. The ameliorating effects of anthocyanins on the cross-linked signaling pathways of cancer dysregulated metabolism. *Pharmacol. Res.* 159, 104895.
- FAO/WHO, 2020. GSFA Online Food Additive Functional Classes [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/gsfaonline/reference/techfuncs.html> (accessed 10.1.20).
- FAO/WHO, 2016. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) - WHO Roster of Toxicological and Epidemiological Experts.
- FDA, 2019. Food Additive Status List | FDA [WWW Document]. URL <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/food-additive-status-list> (accessed 10.1.20).
- Galanakis, C.M., 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends Food Sci. Technol.* 26, 68-87.
- Ghada, B., Pereira, E., Pinela, J., Prieto, M.A., Pereira, C., Calhella, R.C., Stojković, D., Soković, M., Zaghdoudi, K., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., 2020. Recovery of anthocyanins from passion fruit epicarp for food colorants: Extraction process optimization and evaluation of bioactive properties. *Molecules* 25, 3203.
- Gião, M.S., Leitão, I., Pereira, A., Borges, A.B., Guedes, C.J., Fernandes, J.C., Belo, L., Santos-Silva, A., Hogg, T.A., Pintado, M.E., Malcata, F.X., 2010. Plant aqueous extracts: Antioxidant capacity via haemolysis and bacteriophage P22 protection. *Food Control* 21, 633–638.
- GPP, 2018. Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral (GPP) - FRAMBOESA [WWW Document]. URL <https://www.gpp.pt/> (accessed 10.1.20).
- GPP, 2017. Informação de Mercados: Produtos Vegetais [WWW Document]. URL [https://www.gpp.pt/images/GPP/O\\_que\\_disponibilizamos/Publicacoes/Periodicos/BrochuraVegetal2018/](https://www.gpp.pt/images/GPP/O_que_disponibilizamos/Publicacoes/Periodicos/BrochuraVegetal2018/) (accessed 10.2.20).
- He, J., Giusti, M.M., 2010. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 1, 163–187.
- Huang, F., Huang, J., Wan, X., 2019. Influence of virtual color on taste: Multisensory

- integration between virtual and real worlds. *Comput. Human Behav.* 95, 168–174.
- Iberahim, N., Sethupathi, S., Goh, C.L., Bashir, M.J.K., Ahmad, W., 2019. Optimization of activated palm oil sludge biochar preparation for sulphur dioxide adsorption. *J. Environ. Manage.* 248, 109302.
- Jabeur, I., Pereira, E., Barros, L., Calhella, R.C., Soković, M., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, I.C.F.R., 2017. *Hibiscus sabdariffa* L. as a source of nutrients, bioactive compounds and colouring agents. *Food Res. Int.* 100, 717–723.
- JECFA, W., 2019. Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) [WWW Document]. URL <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/search.aspx> (accessed 10.1.20).
- Kamiloglu, S., Ozkan, G., Isik, H., Horoz, O., Van Camp, J., Capanoglu, E., 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 Sci. Technol.* 77, 475–481.
- Karakaya, S., Simsek, S., Eker, A.T., Pineda-Vadillo, C., Dupont, D., Perez, B., Viadel, B., Sanz-Buenhombre, M., Rodriguez, A.G., Kertész, Z., Hegyi, A., Bordoni, A., El, S.N., 2016. Stability and bioaccessibility of anthocyanins in bakery products enriched with anthocyanins. *Food Funct.* 7, 3488–3496.
- Khadhraoui, B., Turk, M., Fabiano-Tixier, A.S., Petitcolas, E., Robinet, P., Imbert, R., Maâtaoui, M. El, Chemat, F., 2018. Histo-cytochemistry and scanning electron microscopy for studying spatial and temporal extraction of metabolites induced by ultrasound. Towards chain detexturation mechanism. *Ultrason. Sonochem.* 42, 482–492.
- Khoo, H.E., Azlan, A., Tang, S.T., Lim, S.M., 2017. Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr. Res.* 61, 1361779.
- Krauze-Baranowska, M., Majdan, M., Hałasa, R., Głód, D., Kula, M., Fecka, I., Orzeł, A., 2014. The antimicrobial activity of fruits from some cultivar varieties of *Rubus idaeus* and *Rubus occidentalis*. *Food Funct.* 5, 2536–2541.
- Kuete, V., Ango, P.Y., Fotso, G.W., Kapche, G.D.W.F., Dzoyem, J.P., Wouking, A.G., Ngadjui, B.T., Abegaz, B.M., 2011. Antimicrobial activities of the methanol extract and compounds from *Artocarpus communis* (Moraceae). *BMC Complement. Altern. Med.* 11, 42.
- Kula, M., Majdan, M., Głód, D., Krauze-Baranowska, M., 2016. Phenolic composition

- of fruits from different cultivars of red and black raspberries grown in Poland. *J. Food Compos. Anal.* 52, 74–82.
- Kumar, N., Singh, A., Sharma, D.K., Kishore, K., 2019. Toxicity of food additives, in: *Food Safety and Human Health*. Elsevier, pp. 67–98.
- Leichtweis, M.G., Pereira, C., Prieto, M.A., Barreiro, M.F., Beraldi, I.J., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., 2019. Ultrasound as a rapid and low-cost extraction procedure to obtain anthocyanin-based colorants from *Prunus spinosa* L. Fruit epicarp: comparative study with conventional heat-based extraction. *Molecules* 24, 1–17.
- Lockowandt, L., Pinela, J., Roriz, C.L., Pereira, C., Abreu, R.M.V., Calhella, R.C., Alves, M.J., Barros, L., Bredol, M., Ferreira, I.C.F.R., 2019. Chemical features and bioactivities of cornflower (*Centaurea cyanus* L.) capitula: The blue flowers and the unexplored non-edible part. *Ind. Crops Prod.* 128, 496–503.
- López, C.J., Caleja, C., Prieto, M.A., Barreiro, M.F., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., 2018. Optimization and comparison of heat and ultrasound assisted extraction techniques to obtain anthocyanin compounds from *Arbutus unedo* L. fruits. *Food Chem.* 264, 81–91.
- Martins, N., Roriz, C.L., Morales, P., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., 2017. Coloring attributes of betalains: A key emphasis on stability and future applications. *Food Funct.* 8, 1357–1372.
- Martins, N., Roriz, C.L., Morales, P., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., 2016. Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends Food Sci. Technol.* 52, 1–15.
- Mazur, S.P., Nes, A., Wold, A.B., Remberg, S.F., Aaby, K., 2014. Quality and chemical composition of ten red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes during three harvest seasons. *Food Chem.* 160, 233–240.
- Metivier, R.P., Francis, F.J., Clydesdale, F.M., 1980. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *J. Food Sci.* 45, 1099–1100.
- Mikulic-Petkovsek, M., Schmitzer, V., Slatnar, A., Stampar, F., Veberic, R., 2012. Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. *J. Food Sci.* 77, C1064–C1070.
- Milivojević, J., Maksimović, V., Nikolić, M., Bogdanović, J., Maletić, R., Milatović, D., 2011. Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild fragaria and *Rubus* berries. *J. Food Qual.* 34, 1–9.

- Mojica, L., Berhow, M., Gonzalez de Mejia, E., 2017. Black bean anthocyanin-rich extracts as food colorants: Physicochemical stability and antidiabetes potential. *Food Chem.* 229, 628–639.
- Moustaka, J., Tanou, G., Giannakoula, A., Adamakis, I.D.S., Panteris, E., Eleftheriou, E.P., Moustakas, M., 2020. Anthocyanin accumulation in poinsettia leaves and its functional role in photo-oxidative stress. *Environ. Exp. Bot.* 175, 104065.
- Mullen, W., Yokota, T., Lean, M.E.J., Crozier, A., 2003. Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MSn. *Phytochemistry* 64, 617–624.
- Noratto, G.D., Chew, B.P., Atienza, L.M., 2017. Red raspberry (*Rubus idaeus* L.) intake decreases oxidative stress in obese diabetic (db/db) mice. *Food Chem.* 227, 305–314.
- Norberto, S., Silva, S., Meireles, M., Faria, A., Pintado, M., Calhau, C., 2013. Blueberry anthocyanins in health promotion: A metabolic overview. *J. Funct. Foods.* 5, 1518–1528.
- Ongkowijoyo, P., Luna-Vital, D.A., Gonzalez de Mejia, E., 2018. Extraction techniques and analysis of anthocyanins from food sources by mass spectrometry: An update. *Food Chem.* 250, 113–126.
- ONU, 2015. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável - Nações Unidas - ONU Portugal [WWW Document]. URL <https://unric.org/pt/objetivos-de-desenvolvimento-sustentavel/> (accessed 10.3.20).
- Pinela, J., Antonio, A.L., Barros, L., Barreira, J.C.M., Carvalho, A.M., Oliveira, M.B.P.P., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., 2015. Combined effects of gamma-irradiation and preparation method on antioxidant activity and phenolic composition of *Tuberaria lignosa*. *RSC Adv.* 5, 14756–14767.
- Pinela, J., Prieto, M.A., Barros, L., Carvalho, A.M., Oliveira, M.B.P.P., Saraiva, J.A., Ferreira, I.C.F.R., 2018. Cold extraction of phenolic compounds from watercress by high hydrostatic pressure: Process modelling and optimization. *Sep. Purif. Technol.* 192, 501–512.
- Pinela, J., Prieto, M.A., Carvalho, A.M., Barreiro, M.F., Oliveira, M.B.P.P., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., 2016. Microwave-assisted extraction of phenolic acids and flavonoids and production of antioxidant ingredients from tomato: A nutraceutical-oriented optimization study. *Sep. Purif. Technol.* 164, 114–124.
- Pinela, J., Prieto, M.A., Pereira, E., Jabeur, I., Barreiro, M.F., Barros, L., Ferreira,

- I.C.F.R., 2019. Optimization of heat- and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* calyces for natural food colorants. *Food Chem.* 275, 309–321.
- REGULAMENTO (CE) N.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro, 2008. *J. Of. da União Eur.* URL <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R1333&from=RO> (accessed 15.4.20)
- REGULAMENTO (UE) N.º 1129/2011 da Comissão [WWW Document], 2011. *J. Of. da União Eur.* URL <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/HTML/?uri=CELEX:32011R1129&from=PT> (accessed 10.1.20).
- Rodriguez-Amaya, D.B., 2016. Natural food pigments and colorants, in: *Current Opinion in Food Science*. Elsevier Ltd, pp. 20–26.
- Sariburun, E., Şahin, S., Demir, C., Türkben, C., Uylaşer, V., 2010. Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. *J. Food Sci.* 75, C328–C335.
- Seeram, N.P., Adams, L.S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H.S., Heber, D., 2006. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9329–9339.
- Sigurdson, G.T., Tang, P., Giusti, M.M., 2017. Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 8, 261–280.
- Sun, Y., Liao, X., Wang, Z., Hu, X., Chen, F., 2007. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanin of extracts using high-performance liquid chromatography - Mass spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.* 225, 511–523.
- Tai, A., Sawano, T., Ito, H., 2012. Antioxidative properties of vanillic acid esters in multiple antioxidant assays. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 314–318.
- Valdés García, A., Maestre Pérez, S.E., Butsko, M., Prats Moya, M.S., Beltrán Sanahuja, A., 2020. Authentication of “Adelita” raspberry cultivar based on physical properties, antioxidant activity and volatile profile. *Antioxidants* 9, 593.
- Wang, L.S., Stoner, G.D., 2008. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett.* 269, 281–290.
- Wright, O.R.L., Phan, A.D.T., Hong, H.T., Netzel, G., Sultanbawa, Y., Netzel, M.E., 2020. Bioactive Anthocyanins in Selected Fruits – A Foodomics Approach, in: *Reference Module in Food Science*. Elsevier.

- Wu, Z., Ferreira, D.F., Crudo, D., Bosco, V., Stevanato, L., Costale, A., Cravotto, G., 2019. Plant and biomass extraction and valorisation under hydrodynamic cavitation. *Processes* 7, 965.
- Zhang, Q., Luna-Vital, D., Gonzalez de Mejia, E., 2019. Anthocyanins from colored maize ameliorated the inflammatory paracrine interplay between macrophages and adipocytes through regulation of NF- $\kappa$ B and JNK-dependent MAPK pathways. *J. Funct. Foods* 54, 175–186.
- Zhao, Y., 2007. Berry crops: Worldwide area and production systems, in: *Berry Fruit: Value-Added Products for Health Promotion*. CRC Press, pp. 15–62.
- Zou, T., Wang, D., Guo, H., Zhu, Y., Luo, X., Liu, F., Ling, W., 2012. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from mulberry and identification of anthocyanins in extract using HPLC-ESI-MS. *J. Food Sci.* 77, 46–50.