



## **Desenvolvimento de conservantes de base natural para a indústria alimentar**

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 de Biotecnologia)

Orientadoras:

Doutora Maria José Alves

Doutora Sandrina Heleno

Proponente:

Edson Miguel Vilanculo (a49095)

**Bragança**

**2021-2022**

This work was financed by FCT and BPI La Caixa Foundation, within the project ‘Aquaevitae - Água Termal Como Fonte de Vida e Saúde’ - “PROMOVE – O futuro do Interior” call 2020.



## AGRADECIMENTOS

A capacidade de saber agradecer e reconhecer o bem feito pelas pessoas que marcam a nossa vida seja por um simples gesto, é um costume que deve ser cultivado com mais frequência na nossa sociedade.

Em primeiro lugar gostava de agradecer às minhas orientadoras, **Doutora Maria José Alves e Doutora Sandrina Heleno**, por me terem dado a oportunidade de trabalhar com profissionais de excelência do seu admirável grupo de investigação. Agradecer também pela oportunidade de poder aprender e apreender em um ramo pelo qual nutro uma certa paixão, demonstrando-se sempre disponíveis para me ajudar e orientar no desenvolvimento da minha dissertação. A vocês um muito obrigado.

À investigadora **Filipa Fernandes**, a si, dizer-lhe muito obrigado é pouco, a verdade é que sem a sua ajuda seria impossível a realização deste trabalho. Agradeço pela sua simpatia, orientação, tempo dedicado a esta dissertação e acima de tudo, pelos conhecimentos que me transmitiu. Meu eterno obrigado de coração por tudo que se tornou para mim e espero que um dia o Pai do céu lhe possa retribuir tamanha bondade no coração.

Aos investigadores do centro de investigação de montanha (Doutores Custódio, Tânia Pires, Filipa Mandim, Josiana Vaz) responsáveis pelos setores onde foram feitos os ensaios deste trabalho. Muito obrigado.

Aos meus pais e irmãos, principalmente à minha mãe **Maria Casimira**. Obrigado, Mãe, por todas as vezes que me ouviu, me apoiou, escutou as minhas mágoas, me deu forças sempre que pensei em desistir e me deu o amor mais importante que há na vida, o da família. Obrigado pelos valores transmitidos.

Não poderia deixar de agradecer ao Instituto Superior de Ciências da Saúde de Moçambique, ao Instituto de bolsas de estudos de Moçambique, ao Centro de Investigação de Montanha e ao Instituto Politécnico de Bragança por permitirem a realização deste sonho, o desenvolvimento deste trabalho e pelos momentos de aprendizagem que me proporcionaram.

Agradeço a **todos**, que de certa forma, contribuíram para a realização desta dissertação seja de uma forma direta ou indireta. Muito obrigado.

## **ABREVIATURAS**

a\* - Cromaticidade vermelho/verde

AOAC - Associação Oficial de Químicos Analíticos

ABTS - Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

AGS – Linha celular tumoral do Adenocarcinoma gástrico

APCCP - Análise de Perigos e Controle Crítico Princípios de pontos

ATS – Água termal com enxofre

ASS-espectrofotometria de absorção atômica

A<sub>w</sub> - Atividade da Água

b\* - Cromaticidade azul/amarelo

B-Boro

BPF - Boas Práticas de Fabricação

°C - Graus Celsius

Ca- Cálcio

CAA- Atividade antioxidante em Linhagem celular

CaCo2 – Linha celular tumoral do colo retal

Cd- Cádmiio

CF - Compostos Fenólicos

CMB - Concentração mínima bactericida

CMF - Concentração mínima fungicida

CMI - Concentração mínima inibitória

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

Cu-Cobre

DCFH - Diclorohidrofluoresceína

DDA - Dose diária admissível

DAD - Detetor de díodos

DMEM - Meio Eagle modificado por Dulbecco

DMSO - Dimetilsulfóxido

DRBC - Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar

DP - Desvio Padrão

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

EC<sub>50</sub> - Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorbância no ensaio do poder redutor

EFSA - Autoridade da Europeia de Segurança Alimentar  
F - Fluor  
FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura  
FBS - Soro fetal bovino  
FDA - Food and Drug Administration  
Fe - Ferro  
GC - Cromatografia gasosa  
GI<sub>50</sub> - Concentração que inibe 50% do crescimento celular  
HBSS - Solução salina equilibrada de Hank  
HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência  
HPLC-DAD-ESI/MS- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de massa  
HPLC-RI- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração  
H<sub>2</sub>O - Água  
INT - Cloreto de iodonitrotetrazólio  
IC<sub>50</sub> - Concentração responsável por 50% da atividade  
L\*- Grau de luminosidade  
LPS-solução de Li polissacarídeo  
Mg- Magnésio  
MYP - Agar MYP base  
MCF7 – Linha celular tumoral do carcinoma da mama  
Mn – Manganês  
ms- massa seca  
MS-espectrofotometria de massa  
NCI-H460-Linha celular tumoral do Carcinoma do pulmão  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
Pb-Chumbo  
PCA - Plate Count Agar  
PLP<sub>2</sub> - Cultura primária de células de fígado de porco  
RAW 264.7 - Linha celular de macrófagos de rato  
Se - Selênio  
SRB - Sulforrodamina B  
TBARS - Inibição da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Trolox -Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

TSB - Caldo de Soja Tríptico

TP - Tempo de Prateleira

TI-Tempo de Incorporação

T0 – 0 dias

T3 –3 dias

T5 - 5 dias

UE - União Europeia

UFC - Unidades Formadoras de Colónias

Vero - Cultura de células de embrião de macaco verde africano

VRBG - Violet Red Bile Glucose Agar

## Índice

AGRADECIMENTOS .....	iii
ABREVIATURAS.....	iv
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabelas .....	xi
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. Aditivos conservantes na indústria alimentar .....	4
1.2. Conservantes artificiais vs conservantes naturais .....	5
1.3. Importância de exploração de matrizes naturais .....	6
1.4. Flor de Castanheiro.....	7
1.4.1. Metodologias de extração de compostos bioativos .....	9
1.4.2. Benefícios e precauções da flor de castanheiro.....	9
1.4.3. Aplicações industriais .....	11
1.5. Alecrim.....	11
1.5.1. Metodologias de extração de compostos bioativos .....	12
1.5.2. Benefícios e precauções.....	13
1.5.3. Aplicações industriais .....	14
1.6. Água Termal.....	15
1.6.1. Aplicações industriais .....	16
1.7. Produtos no mercado com aditivos naturais .....	18
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Objetivo Geral .....	20
3. Material e métodos .....	22
3.1. Amostra .....	23
3.3.1. Processo de preparação dos extratos.....	23
3.4. Avaliação das propriedades bioativas do extrato da flor de castanheiro, do alecrim e dos sais das águas termais .....	25
3.4.1. Atividade antibacteriana .....	25
3.4.2. Atividade antifúngica.....	26

3.4.3.	Citotóxicidade.....	27
3.4.4.	Citotóxicidade em linhas celulares não tumorais.....	28
3.4.6.	Atividade antioxidante dos extratos e sais.....	29
3.4.6.1.	Ensaio antioxidante celular (CAA).....	29
3.4.6.2.	Inibição da peroxidação lipídica (TBARS).....	30
3.5.	Determinação do conteúdo mineral dos sais da água termal.....	31
3.8.	Fenóis Totais.....	33
3.9.	Avaliação das bioatividades dos sinergismos.....	34
3.9.1.	Atividade antimicrobiana e antifúngica.....	34
3.9.2.	Citotoxicidade.....	34
3.9.4.	Avaliação da atividade antioxidante (TBARS e CAA).....	34
3.12.	Incorporação e estabilidade das formulações naturais bioativas num sumo natural de melancia 35	
3.12.1.	Preparação dos sumos.....	35
3.13.	Análises Físicas.....	37
3.13.1.	Determinação da Cor.....	37
3.13.2.	Atividade da Água (Aw).....	37
3.13.3.	pH.....	38
3.13.4.	Viscosidade.....	38
3.14.	Carga Microbiana.....	39
3.14.1.	Preparação das amostras.....	39
3.14.2.	Preparação dos meios de cultura.....	40
3.14.3.	Crescimento microbiano.....	40
3.15.	Determinação do valor nutricional e composição química.....	42
3.15.1.	Valor Nutricional.....	42
3.15.1.3.	Gorduras.....	43
3.15.1.4.	Proteínas.....	44
3.15.1.5.	Hidratos de carbono.....	44
3.15.2.	Composição química dos sumos.....	44
3.15.2.1.	Açúcares livres.....	44
4.	Resultados e Discussão.....	46
4.1.	Propriedades bioativas do extrato da flor de castanheiro, do alecrim e dos sais das águas termais 47	
4.1.1.	Avaliação da atividade antioxidante dos extratos e Sais.....	47
4.1.2.	Atividade antibacteriana.....	49
4.1.3.	Atividade antifúngica.....	53
4.1.4.	Citotoxicidade e atividade anti-inflamatória.....	54
4.2.	Conteúdo mineral dos sais da água termal.....	57

4.3.	Fenóis Totais (flor de castanheiro e alecrim) .....	58
4.4.	Bioatividade das misturas .....	59
4.4.1.	Mistura entre os sais da água termal e do extrato da flor de castanheiro .....	59
4.4.1.1.	Atividade antibacteriana da mistura dos sais da água termal e do extrato da flor de castanheiro	62
4.4.1.2.	Atividade antifúngica da mistura dos sais da água termal e do extrato da flor de castanheiro	64
4.4.2.	Mistura entre os sais da água termal e do extrato de alecrim .....	66
4.4.2.1.	Atividade antibacteriana da mistura dos sais da água termal e do extrato de alecrim ....	68
4.4.2.2.	Atividade antifúngica da mistura dos sais da água termal e do extrato de alecrim .....	70
4.5.	Fenóis Totais, conteúdo em minerais e compostos fenólicos presentes nas diferentes misturas.	72
4.6.	Avaliação dos sumos desenvolvidos.....	81
5.	Considerações Finais .....	92

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Flor de Castanea Sativa Mill. Fonte: Flora-on. ....	8
<b>Figura 2.</b> Rosmarinus officinalis L. Fonte: Flora-on. ....	12
<b>Figura 3.</b> Esquemática do trabalho realizado na presente dissertação .....	21
<b>Figura 4.</b> Extração por maceração da flor de castanheiro.....	24
<b>Figura 5.</b> Extração assistida por ultrassons do alecrim.....	24
<b>Figura 6.</b> Processo de filtragem das amostras.....	25
<b>Figura 7.</b> Inibição da peroxidação lipídica .....	31
<b>Figura 8.</b> Determinação de fenóis totais .....	33
<b>Figura 9.</b> Atividade antimicrobiana sinergismos .....	34
<b>Figura 10.</b> Preparação do Sumo.....	36
<b>Figura 11.</b> Pasteurização dos Sumos .....	36
<b>Figura 12.</b> Sumo enriquecidos com ingrediente natural .....	36
<b>Figura 13.</b> Medição da cor dos sumos .....	37
<b>Figura 14.</b> Determinação da atividade da água nos sumos.....	37
<b>Figura 15.</b> Determinação do pH dos sumos.....	38
<b>Figura 16.</b> Determinação da viscosidade .....	38
<b>Figura 17.</b> Incorporação em meio PCA .....	40
<b>Figura 18.</b> Incorporação dos sumos VRBG.....	41
<b>Figura 19.</b> Incorporação dos sumos MYP .....	41
<b>Figura 20.</b> Incorporação dos sumos DRBC .....	42
<b>Figura 21.</b> Determinação da humidade dos sumos .....	42
<b>Figura 22.</b> Determinação das cinzas nos sumos .....	43
<b>Figura 23.</b> Determinação de gorduras nos sumos .....	43
<b>Figura 24.</b> Determinação de açúcares nos sumos .....	45
<b>Figura 25.</b> Médias marginais estimadas de frutose (A) e açúcares livres totais (B). 84	
<b>Figura 26.</b> Médias marginais estimadas de Na (A) e Mg (B).....	85
<b>Figura 27.</b> Médias marginais estimadas dos sumos para pH (A) e L* (B).....	90
<b>Figura 28.</b> Carga microbiana MYP e VRBG.....	91
<b>Figura 29.</b> Carga microbiana PCA e DRBC.....	91

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Classes de Conservantes .....	5
<b>Tabela 2.</b> Caracterização química da flor de castanheiro. ....	8
<b>Tabela 3.</b> Caracterização do Alecrim.....	12
<b>Tabela 4.</b> Microrganismos selecionados e respectivas condições de crescimento .....	39
<b>Tabela 5.</b> Avaliação da atividade antioxidante dos extratos e sais. ....	48
<b>Tabela 6.</b> Atividade antibacteriana extratos e sais (mg/mL).....	52
<b>Tabela 7.</b> Atividade antifúngica dos extratos e sais.....	53
<b>Tabela 8.</b> Avaliação da citotoxicidade dos sais da água termal e dos extratos da flor de castanheiro e alecrim .....	56
<b>Tabela 9.</b> Minerais Presentes na água termal.....	57
<b>Tabela 10.</b> Fenóis Totais (Flor de castanheiro e alecrim) .....	58
<b>Tabela 11.</b> Avaliação da bioatividade da mistura dos sais de água termal com extrato da flor de castanheiro.....	61
<b>Tabela 12.</b> Atividade antimicrobiana da mistura dos sais da água termal e do extrato da flor de castanheiro.....	63
<b>Tabela 13.</b> Atividade antifúngica da mistura entre os sais da água termal e do extrato da flor de castanheiro.....	65
<b>Tabela 14.</b> Bioatividades da mistura dos sais de água termal com o extrato de alecrim .....	67
<b>Tabela 15.</b> Atividade antibacteriana da mistura dos sais da água termal e do extrato de alecrim .....	69
<b>Tabela 16.</b> Atividade antifúngica da mistura dos sais da água termal e do extrato de alecrim .....	71
<b>Tabela 17.</b> Conteúdo em fenóis totais e minerais da mistura dos sais da água termal com extrato de flor de castanheiro. Resultados expressos em massa seca. ....	73
<b>Tabela 18.</b> Conteúdo em compostos fenólicos de extrato puro de flor de castanheiro e misturas de sais da água termal e extrato de flor de castanheiro na proporção 20:80. Resultados expressos em massa seca.....	75

<b>Tabela 19.</b> Conteúdo em fenóis e minerais das misturas de sais da água termal e do extrato de alecrim. Resultados expressos em massa seca.....	78
<b>Tabela 20.</b> Conteúdo em compostos fenólicos da mistura de sais da água termal e do extrato de alecrim. Resultados expressos em massa seca.....	80
<b>Tabela 21.</b> Composição em açúcares e conteúdo mineral dos sumos ao longo de 5 dias. Resultados expressos em massa fresca. ....	83
<b>Tabela 22.</b> Composição centesimal dos sumos desenvolvidos com incorporação dos sais da água termal (g/100g massa fresca).....	87
<b>Tabela 23.</b> Atividade da água, pH, Viscosidade e cor dos sumos .....	89

## RESUMO

O uso de aditivos conservantes nos produtos alimentares é extremamente importante para garantir a segurança e qualidade dos alimentos, contudo, existe uma grande preocupação com a quantidade de substâncias químicas que lhes são adicionadas. Atualmente, a preferência dos consumidores tem recaído sobre produtos alimentares com baixo teor de aditivos e, quando possível, aditivos naturais, pois são considerados pelo consumidor como elementos menos prejudiciais à saúde. Além disso, verifica-se que é cada vez mais importante a ingestão de alimentos ricos em minerais na dieta diária, visto que, são microelementos que participam em diferentes processos metabólicos dos seres vivos.

Desta forma, o objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de potenciais ingredientes conservantes naturais para indústria alimentar através da formulação de sinergismos entre sais da água termal e extratos da flor de castanheiro e alecrim, com posterior incorporação das formulações em sumos naturais de melancia. Foram determinadas as propriedades bioativas (atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e citotóxica) dos extratos naturais e dos sais da água termal; o perfil fenólico dos extratos e o conteúdo mineral dos sais. Foram definidos diferentes sinergismos (50:50, 20:80, 80:20, 40:60, 60:40), que foram sujeitos a uma caracterização bioativa, fenólica e mineral. Após a seleção dos sinergismos mais promissores, estes foram incorporados num sumo de melancia que foi sujeito a um controlo nutricional, mineral, físico-químico e microbiano ao longo de 5 dias. Os extratos revelaram um conteúdo interessante em compostos fenólicos e os sais da água termal são ricos em minerais. O sinergismo de 20% de sais de água termal com 80% de extrato de flor de castanheiro e o de 20% de sais de água termal com 80% de extrato de alecrim revelaram ter um maior potencial bioativo, sendo selecionados para incorporação nos sumos. Após 5 dias de tempo de prateleira verificou-se que o perfil nutricional, mineral e físico-químico dos sumos não sofreu alterações significativas. Também se verificou que não houve crescimento de microrganismos ao longo dos 5 dias, o que comprova a eficácia dos ingredientes naturais desenvolvidos. No entanto não foi possível corroborar o efeito conservante das formulações, encontrando-se em curso análises dos sumos por um período maior. No entanto, o sumo desenvolvido pode ser considerado um alimento funcional, devido ao seu fortalecimento com sais provindos da água termal, um produto relevante e inovador para a indústria alimentar.

## **ABSTRACT**

The use of preservative additives in food products is important to ensure food safety and quality; however, there is great concern about the amount of chemical substances added to food and consumer preference has been for food products with a low content of additives and, when possible, natural additives, as they are considered by consumers to be less harmful to human health. Just as it is becoming increasingly important to eat foods rich in minerals in our daily diet, since they are microelements that participate in different metabolic processes of living beings.

In this way, the objective of this work consisted in the development of potential natural preservative ingredients for the food industry through the formulation of synergisms between thermal water salts and chestnut flower extracts and between thermal water salts and rosemary extract, with subsequent incorporation of the formulations in natural watermelon juices. The bioactive properties (antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and cytotoxic activity) of natural extracts and thermal water salts were determined, the phenolic profile of the extracts and the mineral content of the salts. Different synergisms were defined (50:50, 20:80, 80:20, 40:60, 60:40), which were subject to a bioactive, phenolic and mineral characterization. And after selecting the most promising synergisms, these were incorporated into a watermelon juice that was subjected to nutritional, mineral, physical-chemical and microbial control over 5 days. The extracts revealed an interesting content of phenolic compounds and the thermal water salts are rich in minerals. The synergism of 20% of thermal water salts with 80% of chestnut flower extract and that of 20% of thermal water salts with 80% of rosemary extract revealed to have a greater bioactive potential, being selected for incorporation in juices. After 5 days of shelf life, it was found that the nutritional, mineral and physical-chemical profile of the juices did not change significantly. It was also verified that there was no growth of microorganisms over the 5 days, which proves the effectiveness of the natural ingredients developed. However, it was not possible to corroborate the preservative effect of the formulations, and analysis of the juices is ongoing for a longer period. However, the juice developed can be considered a functional food, due to its fortification with salts from thermal water, a relevant and innovative product for the food industry.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Aditivos conservantes na indústria alimentar

O mercado alimentar é dos maiores fluxos monetários do planeta. Nos últimos anos o setor tem investido no desenvolvimento e processamento de novos produtos alimentares de forma a ir ao encontro das exigências dos consumidores, que demonstram cada vez mais preferência por alimentos menos processados e com o mínimo de aditivos artificiais adicionados. Este facto, tem levado a que se verifique um alto investimento na investigação por aditivos provenientes de matrizes naturais (Abdelghani & Al-Degs, 2021; Carochó et al., 2014).

A Food and Drug Administration dos Estados Unidos (FDA) define aditivo alimentar como “qualquer substância utilizada para proporcionar um efeito técnico nos alimentos. Os aditivos são usados para manter o sabor, preparação, processamento de alimentos, frescura e segurança” (Carochó et al., 2018).

Segundo o Codex alimentarius (1995) define-se como aditivo alimentar “qualquer substância que normalmente não é consumida como alimento por si só, nem usada como ingrediente, tendo ou não valor nutritivo e sendo intencionalmente adicionada aos alimentos com um propósito tecnológico (e organolético) no seu fabrico, processamento, acondicionamento, transporte ou armazenamento (Carochó et al., 2015).

Assim, de uma forma resumida, pode-se definir os aditivos alimentares como sendo as substâncias adicionadas aos alimentos com o objetivo de manter, conceder ou intensificar as características físicas e organoléticas do produto, impedindo alterações dos mesmos, como perda de cor e sabor, crescimento de microrganismos, entre outras (Karunaratne & Pamunuwa, 2017).

Os aditivos legais aprovados na União Europeia (UE), bem como, a dose diária admissível (DDA) de cada produto encontram-se arrolados no Regulamento 1129 de 2011, estando identificados com um código numérico que inicia com a letra “E” e devem ser utilizadas de acordo com as boas práticas de fabrico, não ultrapassando a quantidade necessária para alcançar o objetivo pretendido aquando da sua adição (Barreiro, et al., 2014; Carochó et al., 2018) . Estes compostos são divididos em várias classes, como por exemplo, corantes, conservantes, aromatizantes, espessantes, texturizantes e acidificantes (Carochó et al., 2014).

Os aditivos conservantes têm a função de retardar ou prevenir a deterioração dos produtos por microrganismos ou oxidação (Fernandes et al., 2020). Este grupo de aditivos (**Tabela 1.**) compreende compostos antimicrobianos, antioxidantes e agentes anti

escurecimento, estando identificados como seguros na União Europeia todos os compostos que estão entre o E200 e o E399 (Carocho, et al., 2014). Embora os aditivos conservantes sejam imprescindíveis para garantir a segurança dos produtos alimentares, não podem ser consumidos livremente, sendo da responsabilidade de entidades reguladoras, como a FDA e a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), o controlo da sua utilização (Takwa et al., 2018).

**Tabela 1.** Classes de Conservantes

<b>Classe</b>	<b>Artificiais</b>	<b>Naturais</b>	<b>Referência</b>
<b>Antimicrobiano</b>	Ácido acético	Terpenos	(Carocho et al., 2014)
	Acetato de potássio	Peptídeos	
	Acetato de cálcio	Polissacarídeos	
	Ácido láctico	Compostos fenólicos	
	Dióxido de carbono		
<b>Antioxidante</b>	Ácido málico		(Carocho et al. 2014; Nguefack et al., 2009)
	Ácido ascórbico	Vitaminas	
	Ácido cítrico	Polifenóis	
	Ácido tartárico	Carotenoides	
	Ácido málico		
	Tocofereóis		
<b>Anti escurecimento</b>	Sulfito	Ácido eritórbico	(Carocho et al., 2014)
		Cisteína	
		4-hexilresorcinol	

### **1.2.Conservantes artificiais vs conservantes naturais**

Com base na sua origem, os conservantes podem dividir-se em 4 grupos fundamentais: naturais (obtidos de animais ou plantas, algas), semelhantes aos naturais (produzidos sinteticamente), modificados dos naturais (conservantes naturais que são modificados quimicamente) e artificiais (compostos sintéticos) (Carocho et al.,2014). Dentre estes, os conservantes artificiais são os aditivos mais utilizados pela indústria alimentar, pois, para além de terem a sua eficácia comprovada por diversos estudos científicos, têm como grande vantagem uma fácil produção em grande escala a baixo custo, estando descritos

como seguros quando ingeridos abaixo dos limites recomendados pelas agências reguladoras (Ng et al., 2019). Lee et al. (2017) estudaram a influência da adição de nitrito de sódio (E250) num produto de carne seca com o objetivo de verificar o seu impacto na qualidade e estabilidade durante o seu armazenamento. Os autores concluíram que o composto em estudo controla a oxidação lipídica da carne, melhorando a cor e as propriedades sensoriais. No entanto, são cada vez mais os estudos que relacionam o consumo excessivo de produtos com aditivos artificiais com reações adversas, nomeadamente reações gastrointestinais, respiratórias, dermatológicas e neurológicas (Caleja et al., 2016). Bruna et al. (2018) descrevem que a ingestão excessiva de benzoato de sódio (E211) pode induzir hiperatividade em crianças, causar urticária e, ainda, pode ser prejudicial para a função do ácido desoxirribonucleico (DNA).

Os aditivos conservantes naturais vieram revolucionar o mercado; se por um lado surgem como alternativas seguras aos conservantes artificiais, por outro vão de encontro às exigências dos consumidores, que cada vez mais optam por alimentos 100% naturais, ou seja, sem qualquer adição de ingredientes artificiais (Ueda et al., 2021). Para além disso, os ingredientes naturais também estão associados a efeitos benéficos para a saúde do consumidor, nomeadamente na prevenção de algumas doenças crónicas (Alaya et al., 2021).

Nesse sentido a investigação científica aliada à indústria alimentar tem explorado várias fontes naturais para extração de moléculas bioativas com potencial conservante (Pedrosa et al., 2021). Carochó et al. (2016) estudaram a utilização de ingredientes à base de flor de castanheiro e erva-cidreira como conservantes naturais, e, demonstraram que os extratos de flores masculinas de castanheiro possuem uma grande quantidade de compostos fenólicos que podem ser utilizados na indústria alimentar para conservar alimentos, como queijos, devido à sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica e a proliferação microbiana. Também, Ueda et al. (2021) analisaram o potencial de conservação de extratos de sálvia e manjeriço em iogurtes e concluíram que estas duas matrizes são fontes promissoras para a conservação destes produtos.

### **1.3.Importância de exploração de matrizes naturais**

As plantas têm um papel fundamental no dia a dia do ser humano. Desde a antiguidade que a sua função não se restringia apenas à alimentação de seres vivos, elas eram também utilizadas no tratamento de doenças na medicina tradicional (Carochó et al. 2016). São

vários os estudos que descrevem a utilização de compostos bioativos obtidos das plantas no tratamento de doenças, como, diarreia, dores de cabeça, disfunção renal, tratamento de acne, dores abdominais, inflamações, diabetes e doenças oculares, demonstrando também ações antifúngicas, inseticidas e antibacterianas (Fernandes et al., 2020.; Lima et al., 2017).

Atualmente, a aplicação das plantas vai muito além do seu potencial terapêutico. Por serem matrizes ricas em compostos bioativos são empregues na indústria farmacêutica, cosmética e alimentar (Carocho et al., 2016). São vários os estudos científicos que classificam as plantas como importantes fontes de ingredientes fisiologicamente ativos, nomeadamente, antocianinas, flavonoides, ácidos fenólicos, ácido carnósico e vitaminas, que quando atuam de forma isolada ou em extratos combinados, apresentam propriedades bioativas como antioxidante, antimicrobiana, anti tumoral e anti inflamatória (Caleja et al., 2016).

A indústria alimentar tem investido muito na procura de novos ingredientes naturais. Num estudo comparativo entre aditivos naturais de *Matricaria recutita* L. (camomila) e *Foeniculum vulgare* Mill (funcho) e um aditivo sintético de sorbato de potássio (E202) realizado por Caleja et al., (2016) na fortificação de iogurtes, demonstrou que os iogurtes fortificados com aditivos naturais apresentaram maior atividade antioxidante comparativamente ao aditivo sintético.

Assim, é desta forma pertinente explorar as matrizes naturais ricas em compostos biologicamente ativos com potencial aplicação industrial.

#### **1.4.Flor de Castanheiro**

As flores de castanheiro (*Castanea sativa* Mill.) (**Figura 1.**) são subprodutos da colheita de castanhas e vários estudos relacionam infusões e decocções de flores de castanheiro com efeitos antioxidantes, antimicrobianos e anti-tumorais, mencionando que estas atividades poderão estar relacionadas com a sua fração fenólica (Carocho et al., 2016).



**Figura 1.** Flor de *Castanea Sativa* Mill. Fonte: Flora-on.

A espécie *C. sativa*, comumente conhecida por castanheiro, pertence à família Fagaceae e pode ser encontrada em vários países mediterrânicos, incluindo Portugal (Carocho, Barros, et al., 2014; UTAD, 2019).

Vários autores traçaram o perfil químico da flor de castanheiro (**Tabela 2.**) possibilitando a conclusão de que é uma matriz rica em compostos bioativos, nomeadamente compostos fenólicos, que podem ser utilizados como ingredientes naturais com potencial de conservação devido à sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica e a proliferação microbiana (Caleja et al., 2019). Alguns estudos também associam os compostos fenólicos a forte atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, anti-hepatotóxica, antidiarreica, antiviral, anti-úlcerosa, antialérgica e vasodilatadora, o que aumenta o interesse por estes compostos (Silva et al., 2020).

**Tabela 2.** Caracterização química da flor de castanheiro.

<b>Composição química</b>	<b>Compostos</b>	<b>Referência</b>
<b>Açúcares</b>	Frutose, glucose, sacarose, trealose, rafinose	Barros et al., (2010); Carocho et al., (2014b)
<b>Ácidos orgânicos</b>	Oxálico, quínico, málico, ascórbico, xiquímico	Barros et al., (2010); Carocho et al., (2014b)
<b>Tocoferóis</b>	$\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ - e $\delta$ -tocoferóis	Barros et al., (2010)
<b>Compostos fenólicos</b>	Flavonóides e taninos hidrolisáveis	Caleja et al., (2019); Carocho et al., (2014b)

#### **1.4.1. Metodologias de extração de compostos bioativos**

O processo de extração representa o passo mais importante na análise de compostos bioativos de matrizes naturais pelo que é importante a seleção de uma técnica de extração ideal antes do isolamento, purificação e identificação (Giacometti et al., 2018). As extrações convencionais mais frequentes para extração de compostos bioativos incluem a destilação por água, destilação a vapor, destilação combinada de água e vapor, maceração ou infusão (Tongnuanchan & Benjakul, 2014). No entanto, tendo em conta limitações como a necessidade de uma quantidade considerável de solvente e maior tempo de extração apresentadas pelas técnicas de extração convencionais como o sistema de Soxhlet e maceração ou sistema de (Vieira et al., 2017), técnicas de extração mais eficientes foram desenvolvidas de forma a aumentar o rendimento de extração, utilizando menos tempo e consumindo o mínimo de solventes durante a extração. As técnicas avançadas incluem extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas, extração de fluido supercrítico, extração de líquido pressurizado, campos elétricos pulsados e descargas elétricas de alta tensão (Giacometti et al., 2018).

Caleja et al. (2019) otimizaram a extração de compostos fenólicos de flores masculinas de castanheiro através da extração assistida por calor, obtendo extratos ricos nestas moléculas quando utilizam as condições: tempo =  $20,0 \pm 37,7$  min, temperatura =  $25,0 \pm 5,7$  °C, solvente =  $0,0 \pm 8,7\%$  de etanol.

#### **1.4.2. Benefícios e precauções da flor de castanheiro**

Nas duas últimas décadas os cientistas têm trabalhado com a indústria na implementação de processos avançados e sustentáveis nas atividades agroindustriais, permitindo a valorização dos subprodutos e, conseqüentemente, a redução do impacto ambiental causado pelos processos industriais (Caleja et al., 2019).

Em Portugal, especificamente na região de Trás-os-Montes, e numa boa parte dos países mediterrânicos, os castanheiros fazem parte da paisagem e os seus produtos têm sido aproveitados para diferentes fins; as castanhas são utilizadas para a alimentação, a madeira para produção de móveis e as folhas são utilizadas para produção de medicamentos (Ammar et al., 2015). Relativamente às flores, após a sua queda, até há pouco tempo eram consideradas um subproduto sem aplicação, no entanto, Carochó et al.

(2014) relatam que a flor de castanheiro é utilizada desde os tempos mais remotos para preparação de infusões devido à presença de elevadas concentrações de compostos fenólicos ativos benéficos para a saúde humana, especialmente no tratamento de gripes, tosse ou diarreia, e até mesmo como fertilizantes naturais.

Alguns estudos associam os compostos fenólicos presentes na flor de castanheiro à alta atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, anti-hepatotóxica, antidiarreica, antiviral, anti-úlceras, antialérgica e vasodilatadora, o que aumenta o interesse por este subproduto (Silva et al., 2020). Estes compostos fenólicos podem ser utilizados como potenciais aditivos naturais, contribuindo para evitar a deterioração e aumentar a vida útil dos produtos alimentares (Carocho et al., 2014; Socaci et al., 2020).

Villavicencio et al., (2018) afirmou que os chás produzidos à base de folhas e flores de castanheiro são utilizados para fins medicinais, como no tratamento de asma, e quando combinados com outros compostos podem ser aplicados na indústria alimentar para a conservação de diversos produtos, beneficiando desta forma a saúde dos consumidores.

Da mesma forma que alguns estudos relacionam a ingestão de flavonoides encontrados na flor de castanheiro, com a melhora da cognição, diminuição e atenuação da neuroinflamação do estresse oxidativo, pelo fato de desempenharem um papel fundamental nas vias que são responsáveis pela proliferação e sobrevivência neuronal (Araújo et al., 2021).

É importante que as flores de castanheiro utilizadas para as finalidades acima descritas não sejam colhidas da árvore, mas sim do solo de forma a evitar a interferência da polinização (Carocho et al., 2014).

Embora as flores de castanheiro sejam descritas como um subproduto de interesse, têm na sua composição algumas moléculas que em doses elevadas podem ser prejudiciais à saúde, como é o caso por exemplo dos taninos, que podem reduzir a absorção de aminoácidos no intestino delgado (Sammani et al., 2021), assim como de alguns flavonóides (quercetina e nangerina) que em doses altas podem atuar como agentes mutagénicos e pró-oxidantes. Desta forma, é fundamental determinar a quantidade de compostos fenólicos nas matrizes naturais para controlar a qualidade e eficácia desses produtos (Ortega et al., 2016; Sammani et al., 2021).

### 1.4.3. Aplicações industriais

As flores masculinas de castanheiro já demonstraram em diversas pesquisas como à de Carochó et al. (2014) que apresentam na sua composição compostos bioativos com excelente potencial para aplicação em diversos ramos industriais como é o caso da indústria alimentar.

No estudo realizado por Carochó et al. (2016) sobre a utilização de ingredientes à base de flor de castanheiro e erva-cidreira como conservantes naturais, os autores propõem a utilização de extrato de flores masculinas de castanheiro como conservantes naturais de queijos, devido à sua capacidade de inibição da peroxidação lipídica e da proliferação microbiana.

Existem estudos que demonstraram o potencial dos compostos fenólicos presentes na flor de castanheiro para aplicação na produção de filmes ativos naturais utilizados como novos materiais antioxidantes em alimentos (Uranga et al., 2018). Compostos como os taninos encontrados na flor de castanheiro são utilizados em diversos ramos industriais, nomeadamente, na produção de adesivos, de bebidas, de ração animal e de conservantes da madeira, entre outras aplicações (Araújo et al., 2021).

### 1.5. Alecrim

*Rosmarinus officinalis* L. (**Figura 2.**) comumente conhecido por alecrim, pertence à família Lamiaceae e é originário de regiões Mediterrâneas, como Portugal, mas, devido à sua natureza adaptativa, pode ser facilmente cultivada em diversas partes do mundo (Aziz et al., 2021; Quintana et al., 2019). Este arbusto perene é caracterizado pelo seu alto teor em compostos fenólicos, nomeadamente em ácido rosmarínico, carnósico e carnosol, que lhe conferem propriedades bioativas como antioxidante, antimicrobiana, antiviral, hepatoprotetora e anticancerígenas (Amaral et al., 2019; Andrade et al., 2018). São vários os estudos que relacionam as suas atividades biológicas com o tratamento de doenças, nomeadamente, aterosclerose, cardiopatia isquémica, distúrbios respiratórios, úlceras gástricas e alguns cancros (Amaral et al., 2019).



**Figura 2.** *Rosmarinus officinalis* L. Fonte: Flora-on.

Para além destas poderosas moléculas, o alecrim também tem na sua constituição nutrientes benéficos à saúde do consumidor, como minerais e vitaminas (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Caracterização do Alecrim

<b>Caracterização</b>	<b>Compostos</b>	<b>Referência</b>
<b>Minerais</b>	Cálcio, ferro, magnésio, fosforo, potássio, sódio, zinco	(Andrade et al., 2018)
<b>Vitaminas</b>	Vitaminas C e B6, riboflavina	(Andrade et al., 2018)
<b>Compostos fenólicos</b>	Ácidos fenólicos Flavonóides	(Amaral et al., 2019; Gonçalves et al., 2019a)

### **1.5.1. Metodologias de extração de compostos bioativos**

Atualmente os extratos de alecrim utilizados em produtos alimentares são obtidos seguindo as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e a Análise de Perigos e Controle Crítico Princípios de pontos (APCCP) (Sánchez et al., 2020). Estes ingredientes podem ser extraídos de raízes, caules, folhas, flores, frutos, sementes e cascas de alecrim (Oliveira et al., 2019). Para obter os extratos comerciais de alecrim, as folhas da planta são desidratadas (a quente) e trituradas, sendo sujeitas de seguida a extrações usando vários solventes, como etanol, metanol, acetona, hexano e água ou uma mistura de solventes (Senanayake et al., 2018). Relativamente à desidratação das plantas, esta pode ser feita

por secagem ao ar, secagem por micro-ondas, secagem em forno ou secagem por congelamento (Aziz et al., 2021).

No que concerne ao processo de extração, existem diferentes métodos para obter extratos ricos em compostos bioativos (Zhong et al., 2021). Os métodos mais usados para a extração recaem sobre a maceração com etanol a diferentes concentrações, refluxo com clorofórmio, extração assistida por ultrassons ou precipitação supercrítica. (Carrubba et al., 2020; Moczkowska et al., 2020). Relativamente à extração por maceração, é um processo simples que consiste na imersão de uma amostra triturada no solvente apropriado num sistema fechado, seguido de agitação constante ou esporádica sujeita a temperaturas baixas. Após a extração, segue-se o processo de separação das partes sólidas do solvente que pode ser feito por filtração, decantação ou clarificação (Alara et al., 2021).

Pedrosa et al. (2021), no estudo que realizaram sobre a conservação de muffins com extratos naturais, otimizaram a extração de alecrim por ultrassons e concluíram que quando aplicam uma potência de 375W numa extração com 80% de etanol a 20°C durante 25 minutos, é possível obter um extrato mais rico em compostos fenólicos.

Por outro lado, Wojcickowski et al. (2021), avaliaram o desempenho de cloreto de colina na extração de compostos bioativos de alecrim, evidenciando que as condições ideais foram a uma temperatura de 65 °C, uma relação líquido: sólido de 40:1 e 50% em peso de água, obtinha-se um extrato com excelente capacidade antioxidante e antimicrobiana.

### **1.5.2. Benefícios e precauções**

Estudos como o elaborado por Amaral et al. (2019) demonstram que os compostos bioativos extraídos do alecrim podem contribuir para o tratamento de algumas doenças, como por exemplo a doença de Alzheimer. Estes compostos possuem propriedades e potencial antigénico que contribuem no alívio da dor, aumentam o poder de memorização do cérebro e o estímulo do fluxo sanguíneo. Estes compostos também estão descritos como benéficos no tratamento da síndrome metabólica pois são capazes de diminuir o peso corporal e as concentrações de colesterol e de triglicéridos (Sánchez et al., 2020). Num estudo desenvolvido por Petiwala & Johnson (2015), os autores demonstraram que o extrato de alecrim padronizado para ácido carnósico diminui a viabilidade celular e induz apoptose em células de cancro da próstata.

Além disso, os compostos fenólicos isolados de extratos de alecrim têm apresentado, tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo*, ações anti-hipertensivas e atividade h pato protetoras. Por outro lado,   possível verificar que são cada vez mais incorporados em alimentos pela indústria de processamento de alimentos para preservar alimentos sensíveis ao oxig nio (Alu et al., 2017; Sedighi et al., 2015).

A avalia o da toxicidade dos compostos bioativos dos extratos   de extrema importância, uma vez que, durante o processo de extra o novos compostos podem ser produzidos, outros compostos podem estar concentrados, o que pode resultar em um problema para a segurança alimentar (Camargo & Herrero, 2017).

A a o do ácido carnósico no organismo pode variar de acordo com a concentra o usada. A baixas concentra es (< 7,5  $\mu\text{M}$ ) não causa nenhum dano às células do organismo, porém concentra es entre 10  $\mu\text{M}$  - 20  $\mu\text{M}$ , interrompem o processo do ciclo celular causando apoptose celular (Petiwala & Johnson, 2015).

Quando se pretende utilizar compostos extraídos do alecrim, tal como de outra matriz natural, como ingredientes alimentares,   importante ter em conta a sua biodisponibilidade após ingestão, pois são escassos os estudos sobre esta temática, sendo assim importante determinar o seu destino metabólico *in vivo* de forma a perceber se os compostos testados são realmente capazes de atingir o tecido alvo (Fromentin et al., 2013).

### **1.5.3. Aplica es industriais**

Na União Europeia, os extratos de alecrim são adicionados aos alimentos e bebidas em níveis de até 400 mg/kg para a conserva o de alimentos, uma vez que evitam a oxida o e contamina o microbiana (Beltra & Roncale, 2002; Nieto et al., 2010).

Estudos como o de Pedrosa et al. (2021) demonstram a potencialidade de ingredientes ricos em compostos bioativos extraídos da planta de alecrim. Pelas propriedades mencionadas anteriormente, os compostos bioativos são utilizados na substitui o de conservantes artificiais nos alimentos, trazendo um grande benefício para o ramo alimentar, uma vez que tem capacidade de prolongar o prazo de validade dos alimentos, reduzem a forma o de sabores ranhosos e odores estranhos nos alimentos, minimizando o desperdício alimentar (Nieto et al., 2018; Senanayake, 2018).

Alguns compostos bioativos como os compostos fenólicos extraídos da planta de alecrim, são empregues na indústria alimentar na produ o de cereais, produtos de

panificação, salgados, nozes, alimentos para animais de estimação, farinhas de proteína animal e ração animal, óleos vegetais, gorduras animais, óleos marinhos, óleos para fritar, molhos para salada, maionese, margarinas e pastas de gordura, queijos, carnes, frutos do mar, molhos e batatas fritas, pois além de atuarem como agentes antimicrobianos, desempenham a função de agentes protetores e neutralizadores de radicais livres, inibindo a oxidação de ácidos gordos insaturados (Carrubba et al., 2020; Senanayake, 2018).

Num estudo elaborado por Pereira et al., (2017), o alecrim foi incorporado a hambúrgueres de frango para sua conservação. O extrato demonstrou grande capacidade antioxidante com uma inibição da peroxidação lipídica de 48,29 % durante os 21 dias de armazenamento, demonstrando desta forma potencial para ser utilizado na conservação de hambúrgueres.

## **1.6. Água Termal**

A medicina termal é usada desde os tempos mais antigos, sendo associada ao tratamento tradicional de algumas doenças (Liang et al., 2015; Valeriani et al., 2018). Torres et al. (2021) define águas termais como “soluções formadas sob condições geológicas específicas e caracterizadas por um dinamismo físico-químico”. Os autores ainda acrescentam que as propriedades terapêuticas destas águas são atribuídas ao seu perfil químico, nomeadamente ao seu conteúdo em minerais (sódio, cálcio e potássio). Assim, as águas termais podem ser classificadas como águas bicarbonatadas, cálcicas, cloradas, ferrosas, fluoretadas, magnésicas, sulfatadas e ricas em sódio (Valeriani et al., 2018).

Atualmente, vários estudos demonstram a eficácia da água termal no tratamento de patologias, como doenças reumáticas e cardiovasculares, patologias cutâneas e regeneração da pele (Cacciapuoti et al., 2020). Hamidzadeh et al., (2017) sugerem que, substâncias presentes na água termal como iodo, enxofre, magnésio, ferro, dióxido de carbono e ácido carbónico, são eficazes para modular o sistema imunológico quando são absorvidas pela pele.

A ingestão de minerais é essencial para o bom funcionamento do organismo e embora seja necessária uma ingestão de pequenas quantidades destes compostos bioativos, quando a sua ingestão é deficiente pode haver uma maior incidência de distúrbios (Gharibzahedi & Jafari, 2017; Quintaes & Diez-Garcia, 2015).

Gharibzahedi & Jafari (2017), no estudo que realizaram sobre a importância dos minerais na nutrição humana, relacionaram o consumo de alguns minerais com as suas

funções biológicas. A título de exemplo, os autores relacionam a importância do consumo de magnésio com a formação de proteínas e contração muscular; o enxofre com a resistência a bactérias, protegendo o organismo de substâncias tóxicas; o flúor com a prevenção de cáries dentárias e com o retardamento da perda de densidade óssea; o ferro com a formação de hemoglobina nos glóbulos vermelhos e com o metabolismo energético.

A água termal apresenta uma vantagem relativamente aos antibióticos no que concerne ao tratamento de doenças, pois diferente dos antibióticos que apresentam uma única identidade química ativa, a água termal é uma solução que apresenta uma combinação complexa de aniões, catiões e oligoelementos, que juntos participam na criação de uma composição farmacológica única (Costantino et al., 2020).

Segundo Marques et al. (2020) estudos *in vivo* demonstram que a ingestão de águas ricas em sulfato de sódio (minerais presentes na água termal) apresentaram um efeito sobre o metabolismo dos hidratos de carbono, que consiste no aumento da resistência a fatores estressantes e podem promover efeitos tróficos da insulina e gastrina com redução significativa no tamanho da úlcera péptica. No entanto, devido às altas temperaturas em que as águas termais se encontram, elas podem interagir fortemente com seu hospedeiro geológico, influenciando a formação de elementos pesados como cobre (Cu), cádmio (Cd) e chumbo (Pb), que podem induzir cancro renal e leucemia se o organismo sofrer uma exposição prolongada a estes metais (Chau et al., 2022). Por outro lado, não é recomendada a utilização de águas termais que apresentem um pH muito baixo (< 5) ou muito alto (> 10) para fins terapêuticos pelo fato de apresentarem características muito ácidas ou básicas para serem seguras (Zajac, 2021).

### **1.6.1. Aplicações industriais**

As águas termais são ricas em minerais e oligoelementos com diversas indicações dermatológicas demonstradas no tratamento de várias patologias. As águas termais são utilizadas no desenvolvimento de hidrogéis, produtos de higiene pessoal, formulações tópicas preparadas e incorporação da produção de nanopartículas que permitem a libertação controlada de fármacos (Araujo et al., 2017; Ribet et al., 2018).

### **1.6.2. Importância do consumo de minerais**

A maior parte dos minerais são de extrema importância para o crescimento e desenvolvimento do corpo humano pela sua participação nos processos metabólicos, na homeostase e por desempenharem um papel importante na construção óssea e desenvolvimento dos músculos (Chongtham et al., 2021). Eles são nutrientes essenciais para os seres vivos pelo facto de não serem produzidos pelo organismo e só ser possível a sua obtenção pela ingestão diária (Gospel et al., 2020).

Assim como existe uma série de minerais que não só produzem diferentes hormónios, mas também regulam um padrão do batimento cardíaco. Alguns minerais são encontrados na estrutura dos dentes (Ca, P e F) e dos ossos (Ca, Mg, Mn, P, B e F), e outros microelementos (Cu, Fe, Mn, Mg, Se e Zn) desempenham um papel vital como parte estrutural em muitas enzimas (Gharibzahedi & Jafari, 2017).

Segundo Tardy et al. (2020) ficou comprovado, recentemente, que a deficiência ou distúrbio de um mineral que seja essencial para o sistema enzimático, pode ter efeitos prejudiciais na formação dos tecidos e nos metabolismos levando ao surgimento de várias doenças. O consumo de alimentos ricos em minerais é importante pois são elementos essenciais na manutenção das estruturas cerebrais, tendo, também, um papel importante nas ligações intercelulares (Gharibzahedi & Jafari, 2017). Por exemplo, o ferro é conhecido por ser fundamental para a diferenciação e proliferação neural. E a sua deficiência pode afetar processos neurais como a maleinização, a arborização dendrítica e a plasticidade neural (Gharibzahedi & Jafari, 2017). O magnésio é um mineral que está envolvido no transporte ativo através da membrana celular do potássio e cálcio, sendo também um elemento fundamental para coordenação neuromuscular e para a transmissão nervosa. Portanto, baixas concentrações do magnésio no organismo, podem levar ao aumento da neuro-transmissão glutâmica, o que pode levar ao estresse oxidativo e à morte das células neuronais (Kirkland et al., 2018).

Assim como o sódio e o potássio, são minerais essenciais para manutenção do equilíbrio eletrolítico, função cardíaca, funções metabólicas específicas, manutenção da pressão sanguínea e eliminação de resíduos no organismo (Gharibzahedi & Jafari, 2017b).

## 1.7. Produtos no mercado com aditivos naturais

Atualmente, são vários os estudos que comprovam a eficácia de ingredientes naturais no melhoramento e conservação de produtos alimentares. Sampaio et al. (2021) investigou as propriedades bioativas de extratos de batata roxa ricos em antocianinas para aplicação como corante numa formulação de sumo, e obtiveram excelentes resultados em todos ensaios, sendo que nenhum efeito tóxico foi detetado. Este trabalho demonstrou que os extratos testados podem ser usados como corantes alimentares naturais e considerados para substituir os artificiais existentes.

Um trabalho desenvolvido por Ueda et al. (2021) com objetivo de demonstrar a possível utilização de sálvia e manjerição como conservantes naturais de iogurtes, foi observado que a incorporação do extrato não alterou as características físico-químicas e nutricionais do iogurte, concluindo que desta forma a sálvia e manjerição possuem potencial como conservantes naturais.

Um exemplo prático é a utilização da flor de *Cynara cardunculus* L. para a produção de anticoagulantes que são incorporados na produção dos tradicionais queijos à base de leite de ovelha (Pires et al., 2021).

Reihani et al. (2014), demonstrou a alta capacidade antioxidante dos extratos naturais de folhas *Cosmos caudatus* Kunth. para preservar produtos cárneos e aumentar o tempo de prateleira contra a oxidação lipídica, e assim, reduzir o efeito prejudicial das gorduras na indústria alimentar.

Atualmente, é possível encontrar no mercado alimentos funcionais enriquecidos com ingredientes naturais, como carnes, produtos de panificação, sumos e sanduíches que contêm adição de *Moringa oleifera* Lam. (Stabnikova et al., 2021). Outro exemplo de aditivo natural é o *Lycium barbarum* L., tradicionalmente conhecido como bagas de goji que são frequentemente usadas no fabrico de chocolates brancos em detrimento de aditivos sintéticos, apresentando uma aceitação positiva da população (Ferreira et al., 2017).

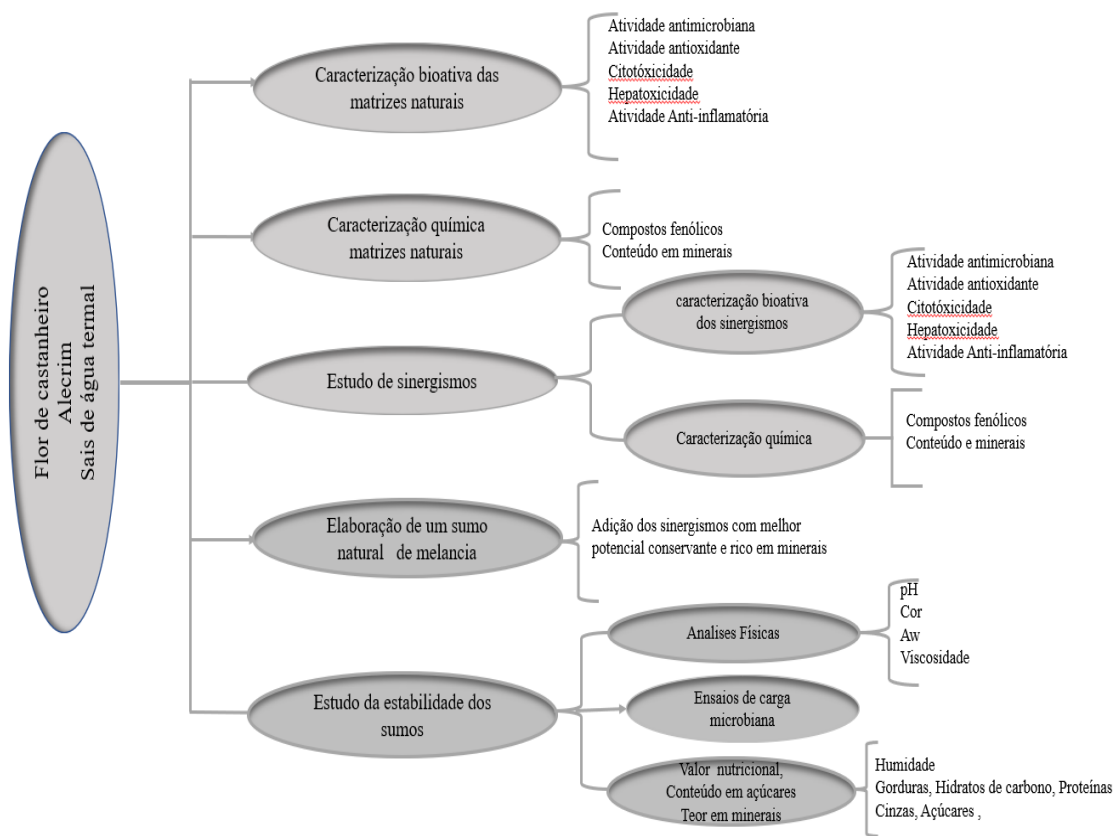
## 2. **OBJETIVOS**

## 2.1. Objetivo Geral

O presente estudo teve como principal objetivo o desenvolvimento de uma formulação com potencial conservante (ex. antimicrobiano e antioxidante), com recurso a matrizes naturais, nomeadamente, flor de castanheiro e alecrim e ainda água termal (individualmente ou possíveis sinergias). Assim como também proceder à avaliação das suas propriedades bioativas, através de vários ensaios *in vitro*. O trabalho apresenta um plano de trabalho ilustrado na **Figura 3**.

Assim, o trabalho foi estruturado seguindo os seguintes objetivos específicos:

- a) Determinação do potencial bioativo: antimicrobiano, antioxidante, citotóxico dos extratos de flor de castanheiro e de alecrim e de água termal (complementada com a identificação de sais);
- b) Caracterização química das matrizes vegetais e da água termal em termos de componentes bioativos por técnicas HPLC-DAD-ESI/MS e absorção atómica, respetivamente;
- c) Estudo do sinergismo da água termal (na forma de sais após desidratação) com os extratos vegetais;
- d) Avaliação do potencial bioativo das formulações à base de água termal e extratos vegetais;
- e) Incorporação da formulação com maior potencial bioativo, utilizando as doses bioativas estabelecidas na etapa anterior, em sumos liofilizados;
- f) Avaliação da estabilidade dos compostos das formulações à base de água termal e extratos vegetais, através da deteção cromatográfica e quantificação de compostos bioativos, como compostos fenólicos e minerais, ao longo do tempo.
- g) Verificação dos efeitos da incorporação no alimento e estabilidade dos ingredientes incorporados, através da análise do valor nutricional, dos parâmetros físico-químicos, da bioatividade dos produtos finais e da avaliação da carga microbiana ao longo da vida de prateleira dos sumos.



**Figura 3.** Esquematização do trabalho realizado na presente dissertação

### 3. **Material e métodos**

### **3.1. Amostra**

As flores de castanheiro foram colhidas de solos da região de Trás-os-Montes. Os sais foram obtidos a partir da desidratação de água termal proveniente das Termas de Chaves. As folhas secas de alecrim que foram adquiridas na empresa Cantinho das Aromáticas, Viveiros, Lda., sedeada em Canidelo, Vila Nova de Gaia Portugal.

### **3.2. Padrões e reagentes**

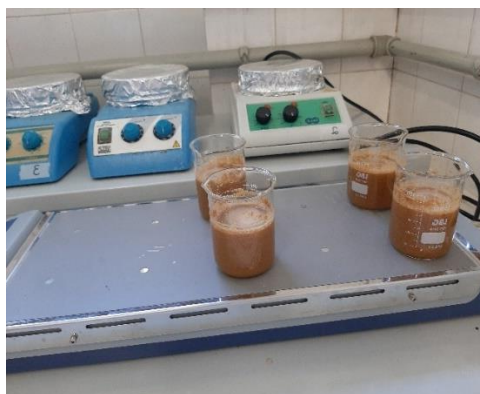
Etanol de grau analítico foi adquirido na Fisher Scientific (Lisboa, Portugal). Os padrões de açúcares D (-)-frutose, D(+)-sacarose, D(+)-glucose, D(+)-trealose, D(+)-rafinose penta-hidrato e D(+)-melezitose, padrão trolox (ácido 6-hydroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico), ácido acético, ácido fórmico, elipticina, sulforrodamina B (SRB), azul de trypan, ácido tricloroacético e Tris foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Relativamente aos padrões dos compostos fenólicos foram adquiridos na Extrasyntheses (Genay Cedex, França). *p*-iodonitrotetrazolium chloride (INT) foi adquirido da Panreac Applichem (Barcelona, Espanha). O sêrum fetal de bovino (FBS), a L-glutamina, a solução salina de Hank's (HBSS), a trypsin-EDTA (ácido etilenediaminatetra acético), a solução de penicilina/streptomina (100 U/mL e 100 mg/mL), o RPMI-1640 (meio Roswell Park Memorial Institute) e o meio DMEM (meio de cultura para células animais (*Dulbecco Modified Eagle*)) foram fornecidos pela empresa Hyclone (Logan, UT, USA).

### **3.3. Preparação dos extratos**

#### **3.3.1. Processo de preparação dos extratos**

As extrações dos compostos bioativos das matrizes vegetais foram realizadas através de metodologias de extração previamente otimizadas.

Para a extração dos compostos bioativos da flor de castanheiro seguiu-se a metodologia descrita por Caleja et al. (2019), onde 6,032g de flores secas foram sujeitas a uma extração por maceração em 100 ml de água destilada à temperatura ambiente durante 20 minutos conforme ilustra a **Figura 4**.



**Figura 4.** Extração por maceração da flor de castanheiro

Relativamente à extração dos compostos bioativos do alecrim, seguiu-se a metodologia otimizada por Pedrosa et al. (2021), realizou-se uma extração assistida por ultrassons com 2,5 g de planta seca triturada em 100 mL de uma solução etanol/água (80:20, v/v), que foi sujeita a uma potência de sonificação de 375 W a 20 °C durante 15 segundos conforme ilustra a **Figura 5**.



**Figura 5.** Extração assistida por ultrassons do alecrim

Após o processo de extração de ambas as matrizes, o sobrenadante foi filtrado utilizando papel de filtro (Whatman N°4) (**Figura 6**). A fração etanólica do extrato foi evaporada a 40 °C (Büchi R-210, Flawil, Switzerland) e a fração aquosa que foi posteriormente congelada e liofilizada (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, USA).



**Figura 6.** Processo de filtragem das amostras

### **3.4. Avaliação das propriedades bioativas do extrato da flor de castanheiro, do alecrim e dos sais das águas termais**

#### **3.4.1. Atividade antibacteriana**

A atividade antibacteriana dos extratos foi efetuada pelo método de microdiluição com o corante INT (cloreto de iodonitrotetrazólio) conforme descrito por Pires et al., (2018). Para a realização deste ensaio, pesaram-se 100 mg de cada extrato (flor de castanheiro, alecrim) e dos sais obtidos da água termal após desidratação. As amostras foram testadas contra cinco bactérias gram-negativo, como, *Enterobacter cloacae* (ATCC 49741), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella enterocolica* (ATCC 13076), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 8610) e três bactérias gram-positivo, nomeadamente (*Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)).

Para a determinações das CMI (concentração mínima inibitória) nas bactérias acima mencionadas, os extratos foram primeiro dissolvidos em 5% (v/v) Dimetilsulfóxido (DMSO) e 95% de água destilada autoclavada de forma a obter-se uma concentração de 20 mg/mL de solução stock. Desta concentração, 90 µL foram adicionados no primeiro poço (microplaca de 96 poços) em duplicado com 100 µL de Caldo de Soja Trípico (TSB).

Nos restantes poços da microplaca foram adicionados 90 µL de meio TSB. Em seguida, as amostras foram diluídas em série para a obtenção dos intervalos de concentração 10 a 0,03125 mg/mL. Por fim, 10 µL de inóculo (padronizado em  $1,5 \times 10^6$  Unidade Formadora de Colônias (UFC)/mL) foram adicionados em todos os poços garantindo a presença de  $1,5 \times 10^5$  UFC.

As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h. A CMI das amostras foi detetada após adição (40 µl) de cloreto de p-iodonitrotetrazólio 0,2 mg / mL (INT) e incubação a 37 °C por 30 min. A CMI foi definida como a menor concentração que inibe o crescimento bacteriano visível determinado pela mudança da coloração de amarelo para rosa se os microrganismos forem viáveis.

A determinação de CMB (concentração mínima bactericida), foi determinada por subcultura em série adicionando 10 µL de amostra retirada de cada poço da microplaca que não apresentou alteração na cor. Estas amostras foram semeadas em meio sólido, ágar Sangue (7% sangue de ovelha) e incubados a 37 ° C por 24 h. A concentração mais baixa que não produziu crescimento determinou o CMB. A CMB foi definida como a concentração mais baixa necessária para eliminar as bactérias. A estreptomicina, metilicina e ampicilina foram usadas como controlos positivos, enquanto 5 % de dimetilsulfóxido (DMSO) foi usado como controle negativo. Os resultados de CMI e CMB foram expressos em mg por mL de extrato.

#### **3.4.2. Atividade antifúngica**

A avaliação da atividade antifúngica nos extratos e nos sais, foi determinada utilizando os fungos *Aspergillus fumigatus* (ATCC 204305), *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) seguindo o procedimento descrito por Pires et al. (2018) . A suspensão de esporos foi ajustada com solução salina estéril para uma concentração de aproximadamente  $1,0 \times 10^5$  UFC em um volume final de 100 µL por poço. As amostras dos extratos e sais, foram primeiro dissolvidas em 5% (v/v) Dimetilsulfóxido (DMSO) e 95% de água destilada autoclavada de forma a obter uma concentração final de 20 mg/mL de solução stock. Em seguida, 90 µL dessa concentração foram adicionados no primeiro poço de uma microplaca de 96 poços em duplicado com 100 µL de Caldo Extrato de Malte (MEB). De seguida, nos demais poços foram pipetados 90 µL de meio MEB e as amostras foram diluídas em série de forma a obter-se o intervalo de concentrações 10 a 0,03125 mg/mL. A determinação da concentração mínima inibitória dos extratos e dos sais sobre os fungos testados, foi realizada por uma técnica de diluição em série. As concentrações mais baixas sem crescimento visível (ao microscópio binocular) foram definidas como CMI. As concentrações mínimas fungicidas (CMF) foram determinadas através de subcultura em série com 2 µL de cada poço que não apresentou mudança de cor, em microplacas contendo 100 µL de caldo de malte por poço e posterior incubadas durante 72h a 28°C.

A menor concentração sem crescimento visível foi definida como CMF. O DMSO a 5% foi utilizado como controlo negativo, enquanto o cetoconazol foi utilizado como controlo positivo. Os resultados de CMI e CMF foram expressos em mg por mL de extrato.

### **3.4.3. Citotóxicidade**

No sentido de se avaliar o potencial citotóxico associado aos extratos e os sais, realizou-se o ensaio da sulforrodamina B (SRB), previamente descrito por Barros et al. (2013). A avaliação da citotoxicidade das amostras foi feita em linhas celulares tumorais humanas, nomeadamente, adenocarcinoma gástrico (AGS), colo retal (CaCo2), carcinoma mama (MCF-7), e carcinoma do pulmão (NCI-H460), que foram mantidas como culturas aderentes em meio RPMI-1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino, glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL) componentes necessários para o seu crescimento.

As culturas celulares foram mantidas numa incubadora a 37 °C e com 5 % de CO<sub>2</sub>, sob uma atmosfera húmida. As células foram utilizadas apenas quando apresentavam 70 a 80% de junção. As amostras foram dissolvidas em aproximadamente 1 mL de água destilada de modo a obter-se uma concentração de 8 mg/mL de solução stock a partir das quais se procedeu a diluições sucessivas obtendo as concentrações a testar (0,125 - 8 mg/mL).

Em primeiro lugar, retiraram-se as caixas que continham as linhas celulares da estufa e descartou-se o meio de cultura que elas continham e adicionando-se o meio de lavagem (HBSS, 2 mL). Em seguida, de forma a descolar as células da parede das caixas, adicionou-se a enzima proteolítica tripsina (1,5 mL) em cada uma delas e posteriormente foram colocadas a incubar na estufa durante 3 minutos. Após o período de incubação, adicionou-se o meio de cultura (3 mL) para inativar a ação da tripsina sobre as células evitando, desta forma, a destruição das mesmas. A suspensão celular obtida foi transferida para um falcon estéril e colocado a centrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e suspendeu-se o pellet em 75 µL de meio de cultura mais 50 µL de corante e fez-se a contagem do número de células em uma câmara de Neubauer (50000 cel/mL). A média da contagem feita nos 4 quadrantes da câmara foi dividida por 2 x 10000. As concentrações finais colocadas em cada microplaca de 96 poços variaram de 400 – 6,25 µg/mL em cada poço, juntamente com o volume de células referido anteriormente, perfazendo-se o volume de cada poço com meio de cultura.

As microplacas foram seladas e guardadas na incubadora durante 24h até ao teste da sulforrodamina B. Após este período de incubação, adicionou-se a cada poço das microplacas ácido tricloroacético frio (TCA, 10%; 100 µL) de modo a parar a ação dos extratos e dos sais sobre as células e incubando-se de seguida durante 1h no frio (4 °C).

As microplacas foram lavadas com água corrente assim que foram retiradas do frio e fez-se a coloração das mesmas com solução de SRB (0,1% em 1% ácido acético; 100 µL) e colocadas a incubar durante 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, lavaram-se as placas com ácido acético (1%) para remover o excesso de SRB e foram deixadas a secar ao ar, fazendo-se a leitura da absorbância a 540 nm em um leitor de microplacas (Bio-Tek, ELX800, Inc; Winooski, EUA). Os resultados obtidos foram expressos em valores de GI<sub>50</sub> (concentração de amostra que inibe 50% de crescimento celular) em unidades de µg/mL.

#### **3.4.4. Citotóxicidade em linhas celulares não tumorais**

A avaliação da hepatotoxicidade dos extratos e dos sais em células não tumorais foi avaliada sobre cultura primária de células de fígado de porco (PLP2). A preparação da cultura celular, designada por PLP2 foi feita a partir de fígado de porco obtido no matadouro local. O tecido de fígado foi lavado com uma solução salina equilibrada de Hank (HBSS), contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e foram obtidos explantes de 1x1 mm<sup>3</sup>.

Os explantes foram colocados em frascos de 25 cm<sup>2</sup> contendo DMEM suplementado com SFB (10 %), aminoácidos não essenciais (2 mM) penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL), e foram incubados numa incubadora a 37°C e com 5% de CO<sub>2</sub>, com atmosfera humidificada. A cada dois dias foi renovado o meio de cultura no sentido de assegurar o crescimento celular, o qual foi acompanhado pela observação no microscópio. As células foram subcultivadas e pipetadas para uma microplaca de 96 poços de forma a se obter uma densidade de 1,0 x 10<sup>4</sup> células/poço. Assim como para a atividade tumoral, também para a PLP2 os resultados são expressos em valores de concentração de extrato que inibe em 50% do crescimento celular – GI<sub>50</sub>.

### **3.4.5. Atividade anti-inflamatória**

A avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos e dos sais foi feita dissolvendo as amostras em DMSO (500  $\mu$ L) e em H<sub>2</sub>O (500  $\mu$ L), obtendo-se soluções *stock* com uma concentração de 8 mg/mL, a partir das quais se procedeu a diluições sucessivas nas concentrações a testar (0,125 - 8 mg/mL). A linha celular de macrófagos de rato RAW 264.7 suplementada com soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor (10 %), glutamina e antibióticos, e mantida numa incubadora a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> e sob uma atmosfera húmida foi a utilizada para este procedimento. A microplaca foi incubada durante 24 horas na incubadora com as condições anteriormente indicadas de forma a permitir uma adequada aderência e multiplicação das células. Após esse período de incubação, as células foram tratadas com as diferentes concentrações dos extratos e dos sais (15  $\mu$ L, 0,125 - 8 mg/mL) e incubadas durante uma hora, sendo que o intervalo de concentrações testadas foi de 6,25 – 400  $\mu$ g/mL. Procedeu-se à estimulação com a adição de 30  $\mu$ L da solução de lipossacarídeo - LPS (1 mL/mL) e incubou-se durante mais 24 horas. Foi utilizada elipsina como controlo positivo e as amostras na ausência de LPS como controlo negativo. Os resultados foram apresentados conforme descrito por Sobral et al., (2016), foram calculados através da representação gráfica da percentagem de inibição da produção de óxido nítrico *versus* a concentração de amostra, e expressos relativamente à concentração de cada um dos extratos que provoca a inibição, em 50 %, da produção de óxido nítrico.

### **3.4.6. Atividade antioxidante dos extratos e sais**

#### **3.4.6.1. Ensaio antioxidante celular (CAA)**

A atividade antioxidante em linhas celulares, foi determinada seguindo o método modificado descrito por Wolfe & Rui (2007). Foram dissolvidas 8 mg de cada amostra em água (H<sub>2</sub>O) de forma a obter-se uma concentração de 8 mg/mL a partir da qual foram feitas diluições sucessivas com 2',7'-diclorohidrofluoresceína (DCFH) preparado com etanol e diluído com HBSS (50 $\mu$ M), obtendo-se as concentrações a serem testadas 500 - 2000  $\mu$ M. Para este procedimento, a linha celular utilizada foi RAW 246.7 (macrófagos de rato), que foi mantida em meio de cultura DMEM suplementado com L-glutamina, penicilina (100 U/mL), estreptomomicina (100  $\mu$ g/mL), soro fetal bovino (10%) e aminoácidos não essenciais (2 mM), numa incubadora a 37°C, com uma atmosfera humidificada e 5 % de CO<sub>2</sub>.

As RAW 246.7 foram separadas com um raspador de células e o conteúdo foi transferido para um falcon. Esta solução foi centrifugada durante 5 minutos a 1200 rpm. O meio foi descartado e a quantidade de meio novo foi adicionada de acordo com o tamanho do pellet obtido com a centrifugação.

Em seguida, uma solução com uma densidade celular de 70.000 células/mL foi preparada e desta foram retirados 300 µL para uma alíquota e transferidos para microplacas pretas com fundo transparente (SPL Lifesciences) e incubadas por 48h. Após o período de incubação, o meio foi descartado e as células foram lavadas com HBSS (2x, 100 µL) e tratadas com diferentes concentrações de extrato 200 µL; 32,5 - 2000 µM e incubadas por 1 hora.

Por fim, fez-se lavagem das células com HBSS (2x, 100 µL) e adicionou-se uma solução de 2,2'-azobisc (2-metilpropionamida) dicloridrato (AAPH) (100 µL; 600 µM). A fluorescência foi lida a cada 5 minutos durante 1 hora (leitor de microplacas Biotek FLx800) a 485 nm de excitação e emissão de 538 nm. A quercetina foi usada como controlo positivo e diclorohidrofluoresceína e o meio de cultura DMEM foram usados como controlo negativo durante a realização do ensaio. Os resultados são dados em percentagem de inibição da oxidação celular.

#### **3.4.6.2. Inibição da peroxidação lipídica (TBARS)**

A avaliação da atividade antioxidante pela inibição da peroxidação lipídica (TBARS) seguiu o procedimento descrito por Souilem et al. (2017): os tecidos cerebrais de porco foram obtidos a partir de animais oficialmente abatidos. Em primeiro lugar, pesou-se 1,2 mg das amostras que foram dissolvidas em 4mL de água destilada. Em seguida colocou-se o cérebro de porco a descongelar e dissolveu-se a mesma com o dobro tampão Tris-HCl correspondente a massa do cérebro de porco (100 mL). Foram pipetados 400 µL de cada uma das amostras em uma microplaca de 48 poços (apenas na primeira posição) para cada extrato e feitas posteriores diluições nos restantes poços em 200 µL de água destilada até completar 8 diluições.

Foram adicionados 100 µL de ácido ascórbico, 100 µL de sulfato de ferro e 100 µL de sobrenadante da suspensão de cérebro de porco em cada uma delas. De seguida a placa foi colocada no banho-maria a 37°C durante 1 hora e depois adicionou-se 500 µL de ácido tricloroacético (28%) e 380 µL de ácido tiobarbitúrico (2%) em cada poço. Depois as placas foram colocadas no banho-maria a 80°C por um período de 20 minutos. As amostras

foram retiradas para tubos de eppendorfs e colocadas a centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante das amostras foi transferido para microplacas de 96 poços, que foram sujeitas a três leituras da absorbância a 532nm em um leitor de microplacas como ilustra a (**Figura 7**).



**Figura 7.** Inibição da peroxidação lipídica

### **3.5. Determinação do conteúdo mineral dos sais da água termal**

A determinação dos minerais nos sais da água termal, foi feita segundo a metodologia descrita por Fernandes et al. (2020) usando um espectrofotômetro de absorção atômica. Foram determinadas as concentrações do K, Na e Mg, Fe, Mn e Cu. Para a realização deste ensaio, 1g de amostra foi dissolvida em 10 mL de ácido nítrico com recurso a ação do calor e do micro-ondas a 200 ° C e 1200 W durante 15 minutos. Após a descida da temperatura, as amostras foram analisadas pela espectrofotometria de absorção atômica.

A determinação dos minerais foi antecedida pela diluição das amostras em uma solução tampão de cério (1:10 mL) para a determinação do sódio e do potássio, solução de lantânio para o magnésio e um nitrato de magnésio como modificador de matriz para o manganês e o cobre. A determinação dos elementos presentes nos sais, foi feita pela comparação das absorvâncias e as soluções analíticas puras.

### **3.6. Determinação de compostos fenólicos nos extratos**

Os extratos para a determinação de compostos fenólicos foram obtidos seguindo as metodologias de extração descritas na secção 3.3. Redissolveu-se 10 mg de extrato em 1 mL de solvente etanol/água (20:80, v/v), para posterior análise num sistema de HPLC-DAD-ESI/MS.

Para a análise das amostras, utilizou-se um sistema Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) que apresenta na sua constituição uma bomba quaternária, um injetor automático (a 5 °C), um degasificador e um compartimento de coluna com termóstato automatizado. Os compostos foram detetados através de um detetor de díodos (DAD), usando os comprimentos de onda de 280 nm, 330 nm e 370 nm, e um detetor de espectrometria de massa (MS).

A separação cromatográfica foi feita usando uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (3 µm, 4.6 mm × 150 mm, Waters, Milford, MA, USA), a 35 °C. A fase móvel foi constituída por 0,1% de ácido fórmico em água (A) e acetonitrilo (B). O gradiente de eluição foi de 15% B (5 min), 15% B a 20% B (5 min), 20-25% B (10 min), 25-35% B (10 min), 35-50% B (10 min), e a coluna foi reequilibrada (10 min), empregando um fluxo de 0,5 mL/min.

Os compostos foram detetados utilizando um espectrómetro de massa Ion Trap Linear LTQ (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA), equipado com uma fonte ESI (fonte de ionização electrospray). Foi usado o azoto (50 psi) como gás de arraste estando o sistema a trabalhar a uma voltagem de spray de 5 kV, com uma temperatura inicial de 325 °C e tensão capilar de -20 V. A voltagem do *tube lens offset* foi mantida a -66 V. Os espectros foram gravados em modo de ião negativo entre 100 e 1500 m/z. A energia de colisão aplicada foi de 35 (unidades arbitrárias). Os dados foram recolhidos e analisados usando o programa Xcalibur® (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA).

Os compostos foram identificados através da informação obtida (tempos de retenção, e espectros UV-Vis e massa) por comparação com os compostos padrão. A quantificação feita obtendo-se as curvas de calibração por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas (2,5-100 µg/mL): taxifolin ( $y = 203766x - 208383$ ;  $R^2 = 1$ ); naringenin ( $y = 18433x + 78903$ ;  $R^2 = 0.9998$ ); caffeic acid ( $y = 388345x + 406369$ ;  $R^2 = 0.994$ ); rosmarinic acid ( $y = 191291x - 652903$ ;  $R^2 = 0.999$ ); baseando-se nos sinais UV-Vis e utilizando o comprimento de onda máximo de absorção de cada composto padrão. Para os compostos que não apresentavam padrões disponíveis, a quantificação foi feita através de curvas de calibração de compostos do mesmo grupo fenólico. Os resultados foram expressos em mg por g de extrato.

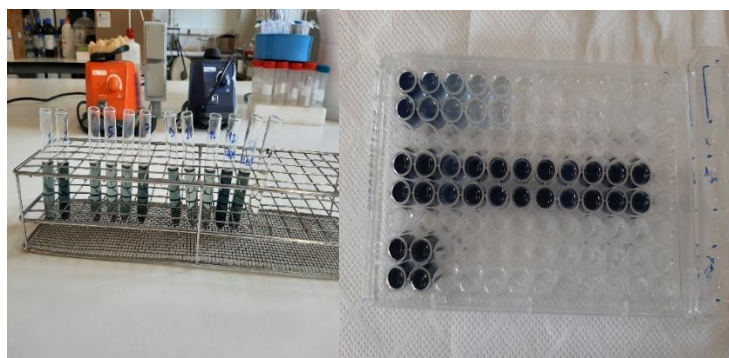
### 3.7. Preparação das misturas entre os sais da água termal e os extratos

Com os resultados da caracterização fenólica, mineral e bioativa das amostras (sais de água termal, extrato de flor de castanheiro e extrato de alecrim), foram delineadas misturas entre os sais da água termal e o extrato da flor de castanheiro nas proporções de 50:50, 20:80, 80:20, 40:60 e 60:40; entre os sais da água termal e o extrato de alecrim nas proporções de 50:50, 20:80, 80:20, 40:60, 60:40.

### 3.8. Fenóis Totais

A determinação dos fenóis totais dos extratos da flor de castanheiro, alecrim e dos sinergismos, foi realizada seguindo a metodologia descrita por Barreira et al. (2008).

Foram dissolvidos 8 mg de cada amostra em 4 mL de H<sub>2</sub>O destilada (soluções-extrato) e posteriormente foi pipetado um volume de 500 µL de cada amostra para tubos de ensaio. Para a reta de calibração, a solução do ácido gálico foi preparada numa concentração de 0,8 mg/mL em H<sub>2</sub>O. Desta solução stock, foram preparadas diferentes concentrações de ácido gálico (0,2 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,025 mg/mL e 0,0125 mg/mL). A solução de carbonato de sódio foi preparada a uma concentração de 75 g/L e 2 mL desta solução foram adicionados às soluções-extrato bem como às diferentes concentrações da reta do ácido gálico. Posteriormente, adicionou-se às diferentes soluções 2,5 mL de uma solução de Folin numa proporção de 1:10, os tubos foram colocados em banho-maria a 40 °C durante 30 minutos. Por fim, procedeu-se à leitura absorvância a 765nm (**Figura 8.**).



**Figura 8.** Determinação de fenóis totais

### **3.9. Avaliação das bioatividades dos sinergismos**

#### **3.9.1. Atividade antimicrobiana e antifúngica**

A avaliação da atividade antimicrobiana (bactérias gram-positivo e gram-negativo) e antifúngica dos sinergismos (**Figura 9.**) foi realizada conforme descrito nas secções 3.4.1 e 3.4.2. deste trabalho.



**Figura 9.** Atividade antimicrobiana sinergismos

#### **3.9.2. Citotoxicidade**

Para a avaliação da atividade citotóxica dos sinergismos foram realizados ensaios em linhas celulares tumorais AGS; CaCo2, MCF-7, e a NCI-H460, tal como descrito anteriormente na secção 3.4.3. E para verificar a hepatotoxicidade das amostras seguiu-se o procedimento descrito na secção 3.4.4 usando uma cultura primária de células de fígado de porco (PLP2).

#### **3.9.3. Atividade anti-inflamatória**

Para a avaliação da atividade anti-inflamatória dos sinergismos foram realizados ensaios em linha celular de macrófagos de rato RAW 264.7, tal como descrito anteriormente na secção 3.4.5.

#### **3.9.4. Avaliação da atividade antioxidante (TBARS e CAA)**

A avaliação da atividade antioxidante dos sinergismos foi realizada em linhas celulares RAW 246.7 e através de um ensaio de inibição da peroxidação lipídica, conforme descrito nas secções 3.4.6.1. e 3.4.6.2. deste trabalho.

### **3.10. Conteúdo mineral presente nos sinergismos**

A determinação do conteúdo mineral presente nos sinergismos foi realizada através da espectrofotometria de absorção atômica. Foram determinadas as concentrações de K, Na, Mg, Fe, Mn e Cu conforme descrito anteriormente na secção 3.5 deste trabalho.

### **3.11. Compostos fenólicos dos sinergismos**

Os sinergismos com melhor potencial bioativo (20:80 de sais e flor de castanheiro e a sinergia 20:80 de sais e alecrim) foram sujeitos a uma caracterização fenólica, seguindo a metodologia descrita anteriormente na secção 3.6.

### **3.12. Incorporação e estabilidade das formulações naturais bioativas num sumo natural de melancia**

As formulações com maior potencial bioativo foram incorporadas em sumos naturais de melancia nas doses ativas e sem demonstração de toxicidade (10 mg/mL), assim o sumo A continha como ingredientes os sais da água termal com extrato de flor de castanheiro na proporção 20:80, respetivamente, e o sumo B continha como ingredientes os sais da água termal com extrato de alecrim na proporção 20:80, respetivamente. Os sumos resultantes foram sujeitos a estudos de estabilidade através da monitorização das propriedades físicas, perfil nutricional, perfil em minerais, conteúdo em açúcares e controlo do crescimento microbiano ao longo de 5 dias.

#### **3.12.1. Preparação dos sumos**

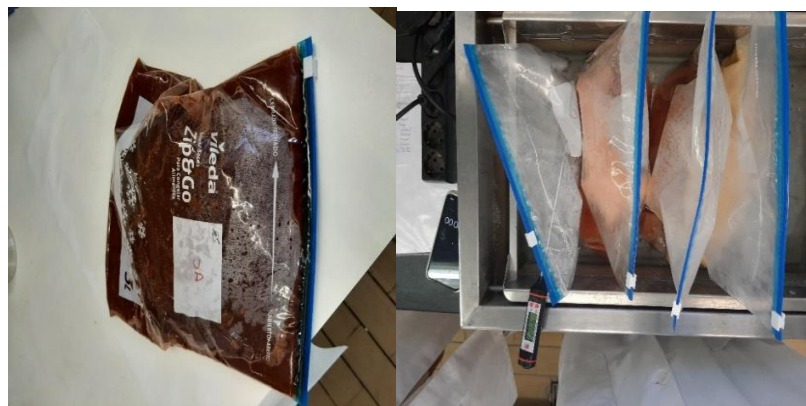
A melancia foi a fruta selecionada para o desenvolvimento de um sumo rico em compostos bioativos, pois, para além ser uma das frutas da época, tem uma quantidade elevada de água, o que permite ter um maior volume de sumo com uma menor quantidade de fruta. Adquiriu-se a melancia para o desenvolvimento do sumo numa das superfícies de supermercado de cidade de Bragança.

O processo de trituração da fruta representado na **Figura 10**, foi realizado com recurso a um liquidificador previamente desinfetado com álcool a 70 % de forma a evitar possíveis contaminações. Foram preparados 3 sumos, em 2 foram incorporados o ingrediente A e B e no terceiro sumo (Sumo C) não foi adicionado qualquer ingrediente, sendo utilizado como controlo.



**Figura 10.** Preparação do Sumo

De seguida, os sumos foram sujeitos a um processo de pasteurização (80°C durante 1 minuto), conforme é ilustrado na **Figura 11**.



**Figura 11.** Pasteurização dos Sumos

Após o processo de pasteurização os sumos foram transferidos para frascos ambar estéreis devidamente rotulados e armazenados a -20° C até posteriores análises (**Figura 12**).



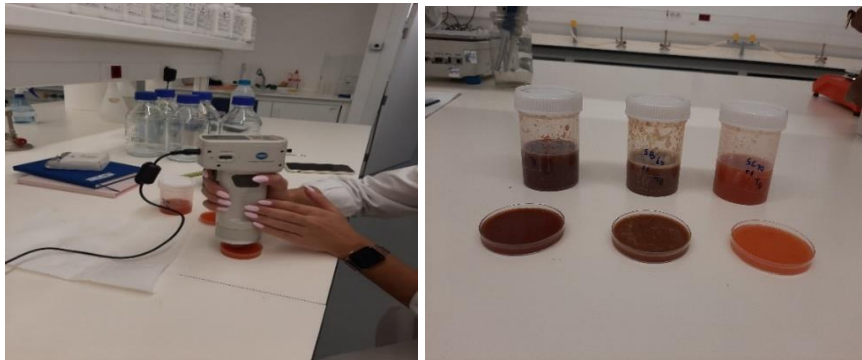
**Figura 12.** Sumo enriquecidos com ingrediente natural

### 3.13. Análises Físicas

Para a caracterização física dos diferentes sumos, foram determinados os seguintes parâmetros: cor, pH, atividade de água e viscosidade.

#### 3.13.1. Determinação da Cor

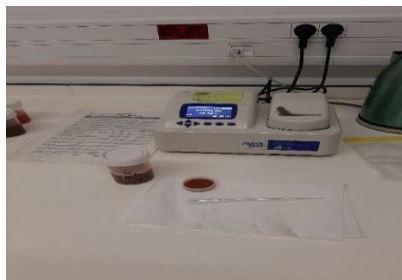
Os parâmetros de cor foram avaliados conforme descrito por Pedrosa et al., (2021) utilizando um colorímetro (modelo CR-400, Konica Minolta Sensing, Inc., Japão), com um adaptador (modelo CR-A50) para materiais granulares. As medições foram feitas no espaço de cor CIE  $L^* a^* b^*$  usando o iluminante C e uma abertura de diafragma de 8 mm. Antes de iniciar as medições, o instrumento foi calibrado contra um azulejo branco-padrão. Para cada sumo a cor foi medida em três pontos diferentes (**Figura 13**), sendo considerado o valor médio.



**Figura 13.** Medição da cor dos sumos

#### 3.13.2. Atividade da Água ( $A_w$ )

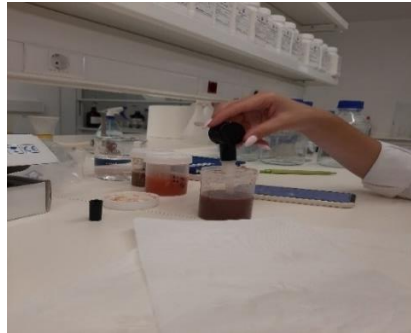
O parâmetro da atividade de água nos sumos foi determinado seguindo a metodologia descrita por Ueda et al., (2021) a partir de um Dew Point Water Activity Meter 4TE (Aqua Lab) conforme ilustra a **Figura 14**.



**Figura 14.** Determinação da atividade da água nos sumos

### 3.13.3. pH

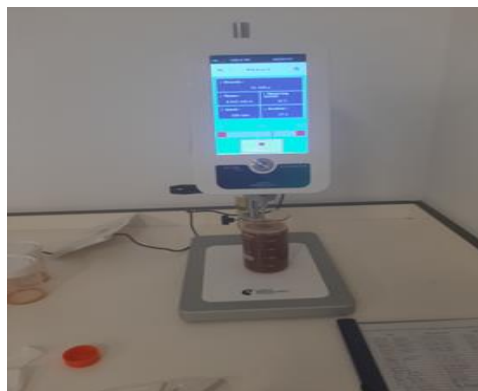
A determinação do valor de pH dos sumos foi efetuada conforme descrito por Ueda et al. (2021) com recurso a um potenciómetro Hanna Instruments HI 902 (RI, EUA), onde se mediram três pontos para cada amostra conforme ilustra a **Figura 15**.



**Figura 15.** Determinação do pH dos sumos

### 3.13.4. Viscosidade

A viscosidade dos sumos A, B e o Sumo controlo foi determinada com recurso a um viscosímetro (**Figura 16.**) seguindo a metodologia descrita por Aguayo et al. (2010), Para a realização deste ensaio, um viscosímetro rotatório (modelo DV-I, Brookfield, Stoughton, Mass., E.U.A.) equipado com uma precisão e adaptador do eixo cilíndrico rotativo (LV1). O sumo foi colocado no adaptador e a viscosidade foi determinada às 150 rpm. com uma duração de ensaio de 60 segundos.



**Figura 16.** Determinação da viscosidade

### 3.14. Carga Microbiana

A carga microbiana dos sumos foi analisada em fresco e ao longo do tempo de prateleira após abertura (dias 0, 3 e 5), aplicando-se a metodologia descrita por Carocho et al. (2019) e seguindo-se os procedimentos da International Organization for Standardization (ISO).

#### 3.14.1. Preparação das amostras

As amostras foram analisadas em triplicado, e para cada triplicado foram preparadas 3 diluições ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ). Para a primeira diluição pipetou-se 1 mL de sumo para um falcon contendo 9 mL de água peptonada (meio de cultura utilizado para o crescimento de organismos não exigentes, mantendo a sua viabilidade durante a manipulação das amostras) e as seguintes diluições foram obtidas de forma sucessiva. Foi analisado o crescimento dos microrganismos mais representativo e causadores de degradação neste tipo de alimentos (**Tabela 4**). Todas as diluições efetuadas nos sumos foram analisadas em duplicado. Foram preparadas 3 diluições para cada triplicado e misturou-se 1mL da amostra do sumo em 9 mL de água peptonada. A partir desta diluição, foram feitas diluições sucessivas ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ). Foram analisados os microrganismos mais representativos e causadores de degradação neste tipo de alimentos (**Tabela 4**). Todas as diluições efetuadas nos sumos foram analisadas em duplicado.

**Tabela 4.** Microrganismos selecionados e respetivas condições de crescimento

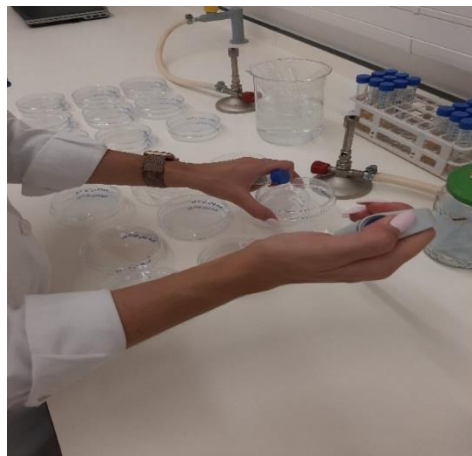
Microrganismos	Meio de cultura	Tempo de incubação
Mesófilos aeróbios totais	PCA	72 h a 30 °C
Bolores/leveduras	DRBC	5 dias a 25 °C
Enterobactérias	VRBG	48 h a 37 °C
<i>Bacillus cereus</i>	MYP	24 h a 37 °C

### 3.14.2. Preparação dos meios de cultura

Para a preparação dos meios de cultura seguiu-se as indicações do fabricante presentes no rótulo, de acordo com as normas ISO 4833-2:2013, 21527-1/2:2008, 21528, 7932.

### 3.14.3. Crescimento microbiano

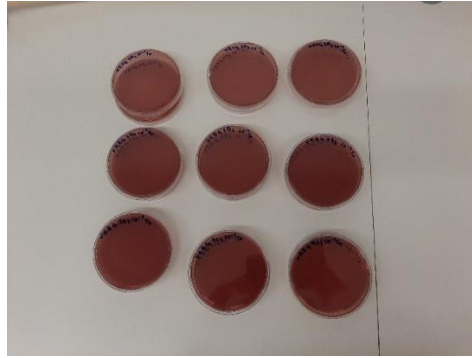
Mesófilos aeróbios totais (técnica de sementeira incorporação - ISO 4833-2:2013). Pipetou-se 1 mL de cada diluição para uma placa de Petri (**Figura 17.**) e adicionou-se 20 mL de meio de cultura PCA (Plate Count Agar) em duplicado. Homogeneizaram-se as placas e após a solidificação do meio foram incubadas a 30 °C durante 72h em posição invertida. A contagem do crescimento microbiano faz-se em todas as placas que contenham mais de 15 colónias e menos de 300.



**Figura 17.** Incorporação em meio PCA

Enterobactérias (técnica de sementeira por incorporação – ISO 21528)

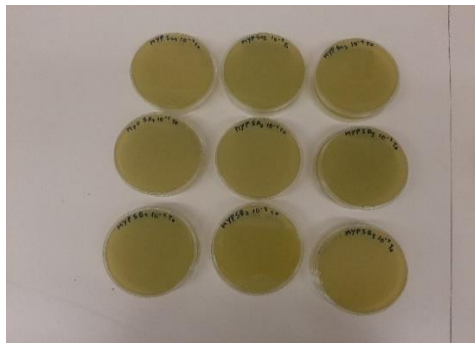
Inoculou-se 1 mL de cada diluição numa placa de petri, à qual se adicionaram 20 mL do meio de cultura VRBG (Violet Red Bile Glucose Agar) (**Figura 18**), em duplicado. As placas foram homogeneizadas e após a solidificação do meio foram incubadas 37°C durante 48h em posição invertida. Tal como para os mesófilos aeróbios totais, a contagem do crescimento microbiano faz-se em todas as placas que contenham mais de 15 colónias e menos de 300.



**Figura 18.** Incorporação dos sumos VRBG.

*Bacillus cereus* (técnica de sementeira por espalhamento - ISO 7932)

Foram pipetados 0,2 mL de cada diluição para uma placa de petri contendo 20 mL do meio de cultura MYP (Agar MYP) solidificado (**Figura 19**), finalizando-se com um processo de espalhamento até o meio absorver por completo a amostra. As placas foram incubadas em posição invertida a 37°C por 24 h. A contagem faz-se em todas as placas que contêm entre 15 e 300 colónias.



**Figura 19.** Incorporação dos sumos MYP

Bolores e leveduras (técnica de sementeira por espalhamento - ISO 21527-1/2:2008)

Foram inoculados 0,2 mL de cada diluição em placas de petri com 20 mL de meio de cultura DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol) solidificado (**Figura 20.**), em duplicado. As placas foram incubadas em posição normal a 25°C durante 5 dias. A contagem faz-se em todas as placas que contêm menos de 150 UFC colónias. O crescimento de leveduras é verificado após 2 dias de incubação e o crescimento de bolores após os 5 dias de incubação.



**Figura 20.** Incorporação dos sumos DRBC

### **3.15. Determinação do valor nutricional e composição química**

#### **3.15.1. Valor Nutricional**

A composição em macronutrientes dos sumos foi determinada através de metodologias oficiais de análise de alimentos (AOAC, 2016). Determinou-se o teor em humidade, cinzas, gordura bruta, proteínas, hidratos de carbono e energia.

##### **3.15.1.1. Humidade**

A determinação da humidade dos sumos foi efetuada seguindo a metodologia descrita por Pedrosa et al. (2021) a partir de um medidor de humidade (PMB 163 Moisture Analyzer, Adam Equipment, Oxford), como mostra a **Figura 21.**, seguindo a metodologia AOAC 925.09. O equipamento é capaz de aquecer a amostra utilizando uma lâmpada de halogénio com potência de 400 W, registando a massa inicial e final da amostra após manutenção de um peso constante durante um intervalo de tempo, e, calculando, por fim, o teor de humidade. O teor em humidade foi expresso em percentagem.



**Figura 21.** Determinação da humidade dos sumos

### 3.15.1.2. Cinzas

Para determinar o teor em cinzas dos sumos seguiu-se a metodologia descrita por Fernandes et al. (2020). 250mg de amostra homogénea de cada um dos sumos em duplicado dos 5 dias de estudo, foi colocada num cadinho de porcelana previamente pesado e submetida a incineração a  $600 \pm 15^\circ\text{C}$  durante cerca de 5 horas. Após esse tempo, foi obtido o peso de amostra resultante da incineração conforme ilustra a **Figura 22.** abaixo. Os resultados foram expressos em g/100 g de massa fresca (mf).



**Figura 22.** Determinação das cinzas nos sumos

### 3.15.1.3. Gorduras

A determinação do teor de gorduras nos sumos seguiu a metodologia descrita por Ueda et al. (2021). Com 3g de cada sumo (por cada tempo) procedeu-se à extração de gordura bruta num sistema de extração Soxhlet a  $120^\circ\text{C}$  durante cerca de 7 horas, utilizando-se éter de petróleo como solvente (**Figura 23.**). A extração foi transferida para um tubo transparente previamente pesado e colocado na estufa a evaporar até se obter peso constante. O teor em gordura bruta foi expresso em g/100 g mf.



**Figura 23.** Determinação de gorduras nos sumos

#### **3.15.1.4. Proteínas**

O conteúdo em proteínas dos sumos (N x 6,25) foi determinado de acordo com o método macro-Kjeldahl seguindo a metodologia descrita por Fernandes et al. (2020). Uma massa conhecida de amostra homogeneizada (250mg) dos sumos foi digerida em ácido sulfúrico com catalisador K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/CuSO<sub>4</sub> durante 70 min a 400 °C num digestor (Bloc Digest 12, JP Selecta, Barcelona). Posteriormente, utilizou-se um destilador Kjeldahl com titulador alcalino integrado (modelo Pro-Nitro-A, JP Selecta, Barcelona). O teor de proteínas foi expresso em g/100g mf.

#### **3.15.1.5. Hidratos de carbono**

O teor em hidratos de carbono foi calculado recorrendo a seguinte fórmula:

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

#### **3.15.1.6. Energia**

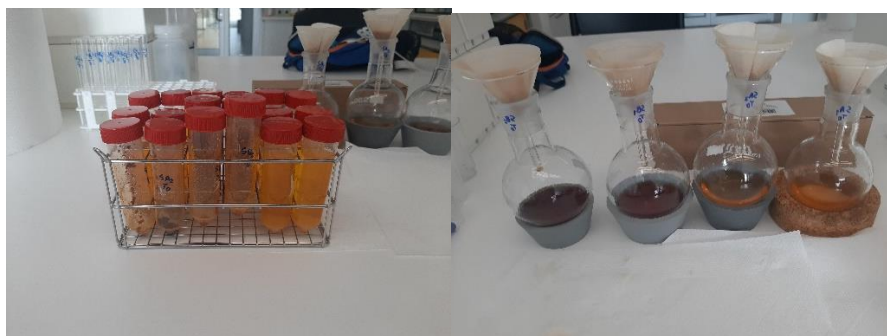
O valor energético fornecido pela ingestão dos sumos em estudo foi determinado através da utilização da seguinte equação:

$$\text{Energia (Kcal/100 g mf)} = 4 \times (\text{g proteínas} + \text{g hidratos de carbono}) + 9 \times (\text{g lípidos})$$

### **3.15.2. Composição química dos sumos**

#### **3.15.2.1. Açúcares livres**

Os açúcares livres dos sumos foram determinados pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI) seguindo a metodologia previamente descrita por Ueda et al., (2021). A 1 g de amostra, em duplicado de cada sumo, foram adicionados 1 mL de padrão interno - a melezitose (PI, 25 mg/mL), e a extração foi efetuada com 40 mL de uma solução etanol/água (80:20, v/v), durante 1h 30 min a 80 °C com agitação (intervalo de 15 minutos) conforme ilustra a **Figura 24**. A fração etanólica foi evaporada (rotary evaporator Büchi R-210, Flawil, Switzerland) a 35°C sob pressão reduzida.



**Figura 24.** Determinação de açúcares nos sumos

A mistura resultante foi transferida para uma ampola de decantação onde foi lavada com éter dietílico (10 mL x 3); A fase aquosa é coletada e transferida para um tubo de ensaio que foi colocado na estufa até evaporar todo o solvente das lavagens. Após a completa evaporação de solvente o extrato de açúcares foi dissolvido para 5mL, e filtrado para um vial através de um filtro de nylon 0,22  $\mu$ m para análise. A identificação dos açúcares foi feita através da comparação com padrões obtidos comercialmente. A análise de dados ocorreu através do software Clarity 2.4 (Data Apex), os resultados foram obtidos pelo método do padrão interno. Os resultados são expressos em g por 100 g mf.

### **3.16. Conteúdo Mineral nos Sumos**

A determinação dos minerais presentes nos sumos foi determinada com recurso a um espectrofotómetro de absorção (ASS) seguindo a metodologia descrita por Fernandes et al. (2020). Neste ensaio foram determinadas as concentrações do Na, K, Mg, Fe, Mn e Cu conforme anteriormente mencionado nas secções 3.5.

### **3.17. Análise estatística**

Ao longo de todo o trabalho, os valores são apresentados por média $\pm$ desvio padrão. Para a classificação dos valores foi usada uma Análise de Variância (ANOVA) com classificação *post-hoc* usando o Teste de Tukey e de Tahmane T2 para amostras com distribuição normal e não normal, respetivamente. No que concerne à análise dos sumos, os valores foram analisados através de uma ANOVA a 2 fatores, com soma de quadrados do tipo III, recorrendo ao software SPSS, versão 25. Este modelo de análise linear multivariado permite tratar os dois fatores TP (tempo de prateleira) e TI (tipo de incorporação) de uma forma independente, permitindo entender a contribuição de cada um deles independente do outro, oferecendo uma melhor compreensão do comportamento dos vários parâmetros.

## **4. Resultados e Discussão**

## **4.1. Propriedades bioativas do extrato da flor de castanheiro, do alecrim e dos sais das águas termais**

### **4.1.1. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos e Sais**

Segundo Carochó et al., (2016) as plantas quando consumidas em forma de infusão ou decocção apresentam diversos efeitos benéficos para a saúde dos seres vivos. No presente estudo, para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos da flor de castanheiro, alecrim e dos sais da água termal, foram utilizados os ensaios *in vitro* (inibição da peroxidação lipídica TBARS e avaliação da atividade antioxidante em linhas celulares RAW 246.7. conforme descrito nas secções **3.4.6.1.** e **3.4.6.2.**, estando os resultados apresentados na **Tabela 5.**

Relativamente aos valores de EC<sub>50</sub> (concentração que proporciona 50% de potencial antioxidante) obtidos no ensaio de TBARS (**Tabela 5.**), os extratos da flor de castanheiro e do alecrim revelaram possuir potencial antioxidante no ensaio realizado. Embora ambos os extratos apresentem resultados muito promissores, o extrato de alecrim apresenta um EC<sub>50</sub> mais baixo que o extrato de flor de castanheiro ( $3,3 \pm 0,1$  ug/mL e  $5,0 \pm 0,1$  ug/mL, respetivamente) significando maior potencial antioxidante. Já os sais de água termal apresentam uma atividade antioxidante baixa, com valores de EC<sub>50</sub> de  $799 \pm 28$  ug/mL.

No ensaio da avaliação da atividade antioxidante nas linhas celulares RAW 246.7, foi o extrato de alecrim que revelou ter um maior potencial antioxidante comparativamente ao extrato de flor de castanheiro. Assim, na concentração máxima testada (2000 µg/mL) o extrato de alecrim inibiu cerca de  $81 \pm 1$  % da oxidação celular, enquanto o extrato da flor de castanheiro inibiu  $43 \pm 1$  %. No entanto, os sais da água termal não apresentaram atividade antioxidante frente às células usadas apresentando valores superiores aos da concentração máxima testada ( $>2000$  µg/mL).

**Tabela 5.** Avaliação da atividade antioxidante dos extratos e sais.

Amostras	TBARS		CAA	
	EC <sub>50</sub> (ug/mL)	Trolox	Inibição na concentração máxima testada (%)	Quercetina (%)
Extrato de flor de castanheiro	5,0 ± 0,1	0,54±0,8	43 ± 1	95 ± 5
Extrato de alecrim	3,3 ± 0,1		81 ± 1	
Sais de água termal	799 ± 28		>2000	

\*CAA – concentração máxima testada 2000 µg/mL.

\*TBARS - - Inibição da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Um estudo realizado por Carochó et al. (2015) onde os autores avaliaram a atividade antioxidante da flor de castanheiro no queijo da serra da estrela através do ensaio DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), os resultados obtidos demonstraram que a amostra apresentou atividade antioxidante com um valor de 99.47 µg/mL. Em outro estudo, também realizado por Carochó et al. (2014b), os autores avaliaram a atividade antioxidante do extrato da flor de castanheiro recorrendo a dois ensaios *in vitro* (Inibição da peroxidação lipídica TBARS e inibição da descoloração do β-caroteno), obtendo resultados que demonstraram que, mais uma vez, a flor de castanheiro possui uma alta capacidade antioxidante, com valores de EC<sub>50</sub> de 38,73 ± 0,001 µg/mL para o ensaio de TBARS e de 48,63 ± 0,01 µg/mL para o ensaio de β-caroteno. Silva et al. (2020) avaliou a atividade antioxidante da flor de castanheiro pelos ensaios químicos *in vitro* (2,2-azino-di-3-etilbenzotiazina-ácido sulfónico (ABTS) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)) obtendo resultados no ensaio ABTS e no ensaio DPPH (5861 ± 5 µg/mL) e (0,03 ± 0,01 µg/mL), respetivamente.

A diferença dos resultados obtidos entre ensaios de avaliação da atividade antioxidante, pode estar relacionada com a especificidade, sensibilidade e baixa quantidade de interferências dos ensaios, assim como, devido ao período de colheita da amostra. No entanto, estes resultados demonstraram o potencial antioxidante apresentado pelo extrato da flor de castanheiro que poderá estar relacionado a fração fenólica presente neste extrato com a principal função de dar cor às plantas e desempenhar um papel básico nas funções bioquímicas das mesmas (Carochó et al., 2015).

Relativamente ao efeito antioxidante do extrato de alecrim obtido neste trabalho ( $3,3 \pm 0,1$   $\mu\text{g/mL}$ ), os resultados corroboram com os obtidos por Pedrosa et al., (2021), onde o alecrim demonstrou ser dos extratos testados (eflúvio de Limão, Oregano, alecrim) aquele que apresentou melhor capacidade antioxidante. Moczowska et al., (2020) avaliaram o efeito antioxidante do extrato de alecrim pelos ensaios químicos DPPH e ABST, obtendo resultados de atividade antioxidante  $95,93 \pm 0,668$  % e  $91,08 \pm 0,754$  % respetivamente, que por sua vez, demonstrou uma excelente atividade antioxidante do extrato. Por outro lado, num estudo realizado por Ribeiro et al. (2016) onde foi avaliado o efeito antioxidante do extrato de alecrim, aplicando ensaio de DPPH, o resultado obtido foi muito inferior em termos de capacidade antioxidante ao obtido neste estudo, com um valor de  $13,24 \pm 0,15$   $\mu\text{g/mL}$ . Igualmente, Pereira et al. (2017) avaliaram o efeito antioxidante do extrato de alecrim pelos ensaios DPPH e ABST. Os resultados por eles obtidos, demonstram um  $\text{EC}_{50}$  de  $127,33 \pm 0,12$   $\mu\text{g/mL}$  e  $203,11 \pm 1,10$   $\mu\text{g/mL}$ , respetivamente. Gonçalves et al. (2019) avaliou a atividade antioxidante do extrato de alecrim recorrendo aos ensaios de poder de redução do ferro (FRAP), capacidade de absorção de radicais de oxigénio (ORAC), DPPH, ABTS e TBARS, obtendo resultados promissores em todos os ensaios efetuados apresentando valores de  $14,93 \pm 0,5$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $6,46 \pm 0,31$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $2,46 \pm 0,25$  mM TE/mg,  $9,06 \pm 0,53$  mM TE/mg e  $260,36 \pm 6,7$   $\mu\text{g/mL}$ . Apesar de alguns ensaios utilizados e das unidades de medida diferirem do trabalho realizado nesta dissertação, os resultados corroboram ao evidenciar a capacidade antioxidante do extrato de alecrim.

Na literatura não foram encontrados resultados sobre a avaliação do efeito antioxidante das águas termais de forma a poder comparar com os obtidos neste estudo.

#### **4.1.2. Atividade antibacteriana**

Nos últimos anos, tem vindo a verificar-se a resistência aos antibióticos causado pelas bactérias e fungos patogénicos devido aos mecanismos de resistência desenvolvidos por esses agentes patogénicos. Neste contexto, vem ganhando mais espaço o interesse de algumas empresas biotecnológicas a exploração de compostos naturais pela capacidade antimicrobiana que estes apresentam (Helena et al., 2010.).

Na **Tabela 6.** estão apresentados os resultados obtidos no ensaio da atividade antibacteriana dos extratos da flor de castanheiro, alecrim e sais da água termal. A capacidade de inibição do crescimento bacteriano das amostras foi determinada frente a

um painel de bactérias que habitualmente são contaminantes alimentares (bactérias gram-positivos e gram-negativos). Os resultados obtidos evidenciaram a capacidade antibacteriana dos extratos frente às culturas bacterianas estudadas. O extrato de flor de castanheiro apresenta atividade bacteriostática frente a todas as bactérias estudadas, com maior concentração mínima inibitória frente a *Staphylococcus aureus* (CMI = 1,25 mg/mL), no entanto este extrato, na concentração máxima testada (10 mg/mL), não apresenta atividade bactericida frente às estirpes estudadas. Em relação ao extrato de alecrim os melhores resultados para a atividade bacteriostática são frentes a *Bacillus cereus* (CMI = 0,3 mg/mL) e *Staphylococcus aureus* (CMI = 0,6 mg/mL), e tal como o extrato de flor de castanheiro, também não apresentou atividade bactericida frente às bactérias estudadas. Foi possível verificar que o extrato de flor de castanheiro, comparativamente ao extrato de alecrim, apresentou melhor atividade bactericida frente a bactérias gram-negativos, contudo foi o extrato de alecrim que revelou os melhores resultados frente às bactérias Gram-positivos. Relativamente aos sais da água termal, estes evidenciaram atividade bacteriostática frente as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica* e *Bacillus cereus* com concentrações mínimas inibitórias de 2,5 mg/mL, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL e 5 mg/mL, respetivamente. No entanto, na concentração máxima testada de (10 mg/mL), os sais não apresentaram nenhuma atividade bactericida frente às estirpes estudadas.

Pedrosa et al. (2021), avaliaram a atividade antibacteriana do extrato de alecrim em bactérias gram-positivos e gram-negativos para a sua incorporação na conservação de muffins de chocolate, aplicando o método de microdiluição. Os resultados evidenciaram excelente atividade antibacteriana do extrato de alecrim tanto em bactérias gram-positivos como em gram-negativos, com CMI inferiores a 1mg/mL, o que vai de encontro aos resultados obtidos neste trabalho. Os mesmos resultados foram obtidos por Sacco et al., (2015) quando avaliou a atividade antimicrobiana *in vitro* da fração fenólica não volátil do extrato de alecrim.

Os resultados obtidos da avaliação antibacteriana dos sais da água termal, demonstraram que estes possuem efeito antimicrobiano frente a alguns microrganismos gram-positivos e gram-negativos, como é o caso da *Escherichia coli* e *Yersinia enterocolitica*, onde a CMI para os sais foi de 2,5 mg/mL. Estes resultados atestam o descrito por Cacciapuoti et al. (2020), quando mencionam que as águas termais, principalmente as ricas em sulfatos, apresentam efeito antimicrobiano, assim como

corroboram com o descrito por Costantino et al. (2020) ao mencionarem que as águas termais possuem efeitos antimicrobianos e muitas das vezes melhores que os antibióticos.

Os resultados obtidos na atividade antibacteriana da flor de castanheiro, são similares aos obtidos por Carochó et al. (2014) quando avalia o efeito antimicrobiano de uma infusão de flor de castanheiro em microrganismos gram-positivos e gram-negativos, onde a flor de castanheiro apresentou CMI entre 0,08 - 0,20 mg/mL. Os resultados do presente trabalho vão ao encontro aos obtidos por Alaya et al. (2021) no desenvolvimento de um conservante com base na flor de castanheiro, onde a CMI da flor de castanheiro em microrganismos gram-positivos e gram-negativos variou entre 0,5 e 1mg/mL. Igualmente, Carochó et al., (2015) avaliou o efeito antimicrobiano da flor de castanheiro em microrganismos gram-positivos e gram-negativos, e os resultados obtidos demonstraram CMIs no intervalo de 0,125-0,500 mg/mL para ambos os grupos de bactérias. Os autores relacionam o poder antibacteriano do extrato da flor de castanheiro com a presença de trigalloyl-HHDP-glucósido e quercetina-*O*-glucósido, assim como, com o largo número de ácidos orgânicos presentes nesta matriz

**Tabela 6.** Atividade antibacteriana extratos e sais (mg/mL).

	Sais		Extrato de Flor Castanheiro		Extrato de Alecrim		Estreptomicina 1mg/mL		Meticiina 1mg/mL		Ampicilina 10mg/mL	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<b>BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVO</b>												
<i>Enterobacter Cloacae</i>	10	>10	2,5	>10	5	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	0,15	0,15
<i>Escherichia coli</i>	2,5	>10	2,5	>10	2,5	>10	0,01	0,01	n.t.	n.t.	0,15	0,15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	>10	2,5	>10	5	>10	0,06	0,06	n.t.	n.t.	0,63	0,63
<i>Salmonella enterocolitica</i>	>10	>10	2,5	>10	5	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	0,15	0,15
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2,5	>10	2,5	>10	2,5	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	0,15	0,15
<b>BACTÉRIAS GRAM-POSITIVO</b>												
<i>Bacillus cereus</i>	5	>10	10	>10	0,3	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	>10	2,5	>10	1,25	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	0,15	0,15
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	>10	1,25	>10	0,6	>10	0,007	0,007	0,007	0,007	0,15	0,15

\*nt- não testado

#### 4.1.3. Atividade antifúngica

Na **Tabela 7.** encontram-se representados os resultados obtidos da avaliação da atividade antifúngica dos extratos da flor de castanheiro, alecrim e dos sais da água termal frente aos fungos *Aspargillus Brasiliensis* e *Aspergillus fumigatus*. Nesta avaliação, o extrato da flor de castanheiro apresentou resultados promissores frente a *Aspergillus brasiliensis* com uma CMI de 1,25 mg/mL na máxima concentração testada (10 mg/mL), contudo a sua capacidade fungicida frente a este microrganismo é de 10 mg/mL, não apresentando atividade fungicida frente a *Aspergillus fumigatus* com um CMI de 10 mg/mL. Para ambos os fungos, os sais da água termal apresentaram CMI iguais (10 mg/mL), contudo os sais não apresentaram capacidade fungicida frente a *Aspergillus fumigatus*.

**Tabela 7.** Atividade antifúngica dos extratos e sais

	Sais		Extrato de flor de castanheiro		Extrato de Alecrim		Keteconazole 1mg/mL	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>Aspargillus brasiliensis</i>	10	10	1,25	10	5	10	0,06	0,125
<i>Aspergillus fumigatus</i>	10	>10	10	>10	10	>10	0,5	1

Carocho et al. (2014) avaliou a atividade antifúngica do extrato da flor de castanheiro em diferentes fungos, entre os quais no *Aspergillus fumigatus* que foi avaliado neste estudo, o qual apresentou uma CMI de 0,45 mg/mL. Alaya et al., (2021) avaliou a atividade antifúngica do extrato da flor de castanheiro frente a diferentes fungos (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium verrucosum var. cyclopium*, *Trichoderma víride*) obtendo CMI que variaram entre 0,25 e 2 mg/mL, demonstrando assim o alto potencial antifúngico do extrato de flor de castanheiro. Carocho et al. (2015) avaliou a atividade antifúngica do extrato da flor de castanheiro em diferentes fungos, onde o *Aspergillus fumigatus* foi inibido a uma CMI de 0,250 mg/mL. Os resultados acima apresentados para o *Aspergillus fumigatus*, diferem dos obtidos neste trabalho, onde a CMI obtida foi de 10 mg/mL. Esta divergência de resultados pode estar relacionada a diferenças dos métodos de extração

utilizados, solvente de extração, assim como as épocas em que foram feitas as colheitas das amostras.

Relativamente ao extrato de alecrim, a CMI obtida para *Aspargillius brasiliensis* e *Aspargillus fumigatus* revelou valores de 5 e 10 mg/mL, respetivamente.

Na literatura encontram-se alguns estudos que corroboram os resultados antifúngicos do extrato de alecrim obtidos neste trabalho. Pedrosa et al. (2021) avaliou o poder antifúngico do extrato de alecrim frente a diferentes fungos e os resultados obtidos demonstraram que *Aspargillus fumigatus* apresentou uma CMI no intervalo de 0 e 0,5mg/mL, resultados diferentes aos obtidos neste estudo. Araújo et al. (2019) estudou a ação antifúngica de diferentes plantas da família *Lamacea*, dentre as quais o extrato de alecrim, demonstrando que este extrato possui uma baixa atividade antifúngica (CMI = 2000 µg/mL).

#### **4.1.4. Citotoxicidade e atividade anti-inflamatória**

Na **Tabela 8.** estão apresentados os resultados obtidos referentes à citotoxicidade e à atividade anti-inflamatória dos extratos da flor de castanheiro, de alecrim e dos sais da água termal.

Em relação à avaliação da citotoxicidade, o extrato da flor de castanheiro apresentou atividade anti-proliferativa para todas as linhas celulares tumorais (AGS, MCF-7, CaCo2), com valores de GI<sub>50</sub> de  $93 \pm 6$ ,  $252 \pm 11$  e  $279 \pm 26$  µg/mL respetivamente. Os resultados obtidos pelo extrato de alecrim são semelhantes aos do extrato de flor de castanheiro, no entanto, o extrato de alecrim demonstrou ter menor capacidade de inibição da proliferação celular frente a AGS (GI<sub>50</sub> =  $151 \pm 3$  µg/mL). No que diz respeito aos sais, estes não apresentaram atividade anti-proliferativa frente às linhas tumorais testadas.

Na avaliação da toxicidade das amostras em cultura de células primarias PLP2, tanto o extrato de flor de castanheiro como o extrato de alecrim e os sais não revelaram toxicidade à máxima concentração testada.

Relativamente à atividade anti-inflamatória testada em macrófagos de ratos, nenhuma das amostras demonstrou capacidade anti-inflamatória.

Um estudo desenvolvido por Alaya et al. (2021) avaliou a atividade citotóxica do extrato da flor de castanheiro utilizando as mesmas linhas celulares tumorais utilizadas neste estudo, verificando que o extrato apresentou alta capacidade anti-proliferativa com valores de GI<sub>50</sub> de  $58 \pm 3$  (AGS),  $141 \pm 5$  (MCF-7) e  $39 \pm 1$  (CaCo2) µg/mL, valores

inferiores aos obtidos neste trabalho. Os autores verificaram ainda a toxicidade do extrato frente a linhas celulares VERO (linha celular de rim de embrião de macaco africano), obtendo valores de  $GI_{50}$  de  $110 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ . Relativamente à atividade anti-inflamatória os autores avaliaram em linhas celulares RAW 267.4, e contrariamente aos resultados obtidos neste trabalho, o extrato demonstrou capacidade anti-inflamatória com  $IC_{50}$  de  $195 \pm 8 \mu\text{g/mL}$ . Em um outro estudo realizado por Carochi et al. (2014b) os autores avaliaram a ação anti-proliferativa e hepatotóxica da flor de castanheiro em diferentes linhas celulares dentre as quais as linhas celulares MCF-7 e PLP2, obtendo atividade anti-proliferativa da flor de castanheiro nas linhas celulares MCF7 com valores de  $GI_{50}$  igual a  $292,64 \pm 0,81 \mu\text{g/mL}$ . No entanto, o extrato não demonstrou ter efeito tóxico nas células não tumorais PLP2.

Em estudos publicados sobre o extrato de alecrim, um trabalho realizado por Pedrosa et al., (2021) avaliou o efeito citotóxico do extrato de alecrim, demonstrando que o extrato não possuía efeito tóxico em células PLP2 ( $GI_{50} >400 \mu\text{g/mL}$ ) mostrando a segurança do extrato para o seu consumo. Gonçalves et al. (2019) também avaliou o efeito anti-proliferativo do extrato de alecrim em linhas celulares tumorais MCF-7, NCI-H460, HeLa, HepG2, e ainda em linhas primárias PLP2. Contrariamente aos resultados obtidos neste estudo, o extrato não demonstrou capacidade anti-proliferativa frente à linha celular MCF-7.

Não foram encontrados estudos sobre a avaliação do potencial citotóxico e anti-inflamatório dos sais da água termal. No entanto, Araújo et al. (2017) afirmou que as águas termais são aplicadas em diferentes tratamentos entre os quais o tratamento de doenças inflamatórias. Mokdad et al. (2022) avaliou a ação anti-inflamatória da água termal encapsulada em lipossomas de células de macrófagos de rato (RAW 264.7), e evidenciou que a água termal encapsulada nos lipossomas apresentava um efeito anti-inflamatório. Por outro lado, Silva et al. (2020) quando avaliou a ação anti-inflamatória das águas termais portuguesas em células de macrófagos de rato, demonstrou que as águas termais com grandes concentrações de sulfatos, bicarbonato de sódio, cloro e sódio, foram aquelas que apresentaram resultados mais promissores.

**Tabela 8.** Avaliação da citotoxicidade dos sais da água termal e dos extratos da flor de castanheiro e alecrim

	Sais	Extrato de Flor Castanheiro	Extrato de Alecrim	Elipticina (controlo positivo)
<b>ATIVIDADE ANTI-PROLIFERATIVA</b> (GI <sub>50</sub> , µg/mL)				
AGS	>400	93 ± 6	151 ± 3	1,23 ± 0,03
MCF-7	>400	252 ± 11	172 ± 18	1,02 ± 0,02
CaCo2	>400	279 ± 26	251 ± 26	1,01 ± 0,01
NCI-H460	-	-	-	1,01 ± 0,01
<b>TOXICIDADE</b> (GI <sub>50</sub> , µg/mL)				
PLP2	>400	>400	>400	1,4 ± 0,1
<b>ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA</b> (IC <sub>50</sub> , µg/mL)				
RAW	>400	>400	>400	6,3 ± 0,4

#### 4.2. Conteúdo mineral dos sais da água termal

Os minerais encontrados na água termal são elementos eficazes no alívio da dor e de vários parâmetros de interesse clínico como por exemplo, osteoartrite do joelho e da mão, dor lombar crónica, artrite reumatoide, impactando desta forma na qualidade de vida do homem (Valeriani et al., 2018). Os resultados do conteúdo em minerais dos sais da água termal estão apresentados na **Tabela 9**. Foram detetados 6 minerais, onde o sódio (Na) e o potássio (K) foram os minerais encontrados em maior quantidade, apresentando concentrações de  $16222 \pm 621$  mg/100 g ms e  $2285 \pm 177$  mg/100 g ms, respetivamente, tendo-se verificado uma quantidade muito baixa de cobre (Cu).

**Tabela 9.** Minerais Presentes na água termal

Minerais	Concentração (mg/100 g ms)
[K] (mg/100 g ms)	$2285 \pm 177$
[Na] (mg/100 g ms)	$16222 \pm 621$
[Mg] (mg/100 g ms)	$278 \pm 5$
[Fe] (mg/100 g ms)	$6,3 \pm 0,6$
[Mn] (mg/100 g ms)	$17,3 \pm 0,2$
[Cu] (mg/100 g ms)	$0,34 \pm 0,03$

\*mg/100 g ms- miligrama por cada 100 gramas de massa seca

Os resultados obtidos neste trabalho, atestam o descrito por Araujo et al. (2015) quando afirmam que as águas termais portuguesas são descritas como sendo águas com altas concentrações de minerais. Os resultados também corroboram com os obtidos por Torres et al., (2021b), onde a determinação de minerais na água termal, evidenciou que o sódio e o potássio foram os minerais encontrados em maior quantidade. Num estudo sobre a determinação de minerais nas águas termais de Chaves elaborado por Marques et al., (2020), os autores verificaram que o K está presente numa concentração de 668 mg/1000g e o Na numa concentração de 62,5 mg/1000g. A concentração de Na está de acordo com a obtida por Mokdad et al., (2022) onde o valor obtido foi de 2936,65 mg/1000g destacando-se como o mineral em maior concentração. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, existem diferenças em termos de concentrações frente a Nunes et al., (2019) onde o Na foi o mineral em maior concentração com 97,8 mg/1000g. Esta

divergência de resultados em termos de concentrações dos minerais, reforça a ideia defendida por Araújo (2017) ao afirmar que a concentração de minerais na água termal muitas das vezes depende da região onde elas são extraídas.

### 4.3. Fenóis Totais (flor de castanheiro e alecrim)

A fração fenólica das plantas pode ser usada como um indicador das suas propriedades antioxidantes que atuam reduzindo o efeito destrutivo causado pelos radicais livres. (Afshar et al., 2021). Caleja et al. (2019) afirmou que as moléculas mais bioativas dos compostos fenólicos são normalmente encontradas em flores e não nas frutas. Na **Tabela 10**, são apresentados os resultados da determinação de fenóis totais nos extratos da flor de castanheiro e alecrim. O extrato da flor de castanheiro, apresentou uma concentração de fenóis totais de  $16,9 \pm 0,6$  mg/g de extrato e o extrato de alecrim uma concentração de  $17,4 \pm 0,2$  mg/g de extrato.

**Tabela 10.** Fenóis Totais (Flor de castanheiro e alecrim)

Amostra	Fenóis totais (mg/g extrato)
Extrato de Flor de Castanheiro	$16,9 \pm 0,6$
Extrato de Alecrim	$17,4 \pm 0,2$

Os resultados relativos à concentração de fenóis totais no extrato da flor de castanheiro estão de acordo com os resultados obtidos por Caleja et al., (2019). No estudo sobre o desenvolvimento de conservantes tendo como base os extratos da flor de castanheiro, os autores quantificaram  $14,90 \pm 1,09$  mg de fenóis totais por grama de extrato. Também Barros et al. (2013) num estudo onde fizeram a caracterização fenólica do extrato de flor de castanheiro, quantificaram  $18,97 \pm 0,04$  mg de fenóis totais em 1 g de extrato.

Relativamente à concentração de fenóis totais obtida no extrato de alecrim, esta revelou valores mais baixos que os resultados obtidos por Moczowska et al. (2020), onde os autores quantificaram  $32,42 \pm 0,664$  mg de fenóis totais por cada grama de extrato. Os resultados obtidos neste estudo diferem dos obtidos por Pereira et al. (2017a) com um valor médio de fenóis totais no extrato etanólico de alecrim de  $40,15 \pm 0,15$  mg/g. Esta diferença verificada na concentração dos fenóis totais para os estudos acima mencionados pode estar relacionada com quantidade de extrato de alecrim por eles utilizada (30 g e 2

g, respetivamente), bem como pelas condições de extração utilizadas em ambos (3 h em 320 ml, etanol a 80 °C e 15 ml de etanol 80% a 70 °C em banho-maria por 30 min, respetivamente), diferindo desta forma com o nosso ensaio que utilizou uma quantidade extrato de (2.5g) seguindo as condições ótimas de extração descritas por (Pedrosa et al., 2021). No entanto, esta concentração de fenóis totais no extrato de alecrim aqui apresentada, reforça a ideia de que a capacidade antioxidante deste extrato poderá estar ligada a fração fenólica por eles apresentada.

#### **4.4. Bioatividade das misturas**

As plantas com capacidade bioativa, quando adicionadas aos alimentos são conhecidas por proteger a saúde humana e reduzir o risco de doenças crônicas, como doenças gastrointestinais, cardiovasculares e o cancro conforme descrito por (Afshar et al., 2021).

##### **4.4.1. Mistura entre os sais da água termal e do extrato da flor de castanheiro**

Na **Tabela 11.** estão representadas as diferentes bioatividades analisadas, nomeadamente a atividade antioxidante, anti-proliferativa e anti-inflamatória, bem como, a toxicidade dos diferentes extratos.

Relativamente à citotoxicidade, o ensaio da avaliação do efeito anti-proliferativo efetuado nas linhas celulares AGS, MCF-7, CaCo2 e NCI-H460, evidenciou que a mistura entre os sais da água termal e o extrato da flor de castanheiro não apresentou efeito anti-proliferativo, com exceção da mistura na proporção 40/60 que apresentou um efeito anti-proliferativo em linhas celulares AGS com um  $GI_{50}$  de  $265 \pm 25 \mu\text{g/mL}$ . A ausência de ação anti-proliferativa na mistura entre os sais da água termal e o extrato da flor de castanheiro sobre as linhas celulares testadas, pode estar relacionada com o facto de os sais diminuírem a concentração dos fenóis totais presentes nos extratos. No entanto, a avaliação da hepatotoxicidade desta mistura em linhas celulares PLP2, demonstrou que a mesma não apresentava efeito tóxico sobre a cultura de células primárias, tendo apresentado valores de  $GI_{50}$  em todas as proporções superiores a  $400 \mu\text{g/mL}$ . A mistura entre os sais da água termal e a flor de castanheiro demonstrou não possuir ação anti-inflamatória em linhas celulares RAW, tendo apresentado valores de  $IC_{50}$  superiores a  $400 \mu\text{g/mL}$  em todas as proporções testadas. Em relação à atividade antioxidante, no ensaio CAA, que utiliza linhas celulares para quantificar a capacidade antioxidante, não foram encontrados valores estatisticamente diferentes entre as amostras, à exceção da amostra

na proporção de 20/80, o que faz crer que houve um efeito pro-oxidante, pois grande parte dos compostos antioxidantes estão presentes nas amostras de flor de castanheiro.

Em relação ao ensaio TBARS, a amostra com melhor capacidade antioxidante (valor mais baixo) foi a que continha um maior volume de extrato de flor de castanheiro na proporção 20/80, seguida da amostra na proporção 40/60, evidenciando claramente que os antioxidantes diminuíaam com a redução do volume do extrato de flor de castanheiro nas amostras, culminando na amostra 80/20 com a menor quantidade.

Estes resultados confirmam o poder antioxidante destes extratos devido à alta concentração de compostos fenólicos por eles apresentada, que segundo Mark et al. (2019) atuam de forma a impedir a degradação dos frutos e vegetais aumentando o seu tempo de prateleira.

**Tabela 11.** Avaliação da bioatividade da mistura dos sais de água termal com extrato da flor de castanheiro.

		Atividade antioxidante		Atividade anti-proliferativa (GI50, µg/mL)				Toxicidade (GI50, µg/mL)	Atividade anti-inflamatória (IC50, µg/mL)
		CAA (%)	TBARS (EC <sub>50</sub> ug/mL)	AGS	MCF-7	CaCo2	NCI-H460	PLP2	(EC <sub>50</sub> ug/mL)
<b>Sinergismos</b> <b>Sais de água termal / extrato de flor de castanheiro</b>	50/50	87 ± 4 <sup>a</sup>	20,2 ± 0,1 <sup>c</sup>	>400	>400	>400	>400	>400	>400
	20/80	> 400 <sup>b</sup>	10,09 ± 0,07 <sup>a</sup>	>400	>400	>400	>400	>400	>400
	80/20	87 ± 1 <sup>a</sup>	214,6 ± 0,5 <sup>e</sup>	>400	>400	>400	>400	>400	>400
	40/60	84 ± 6 <sup>a</sup>	19,21 ± 0,02 <sup>b</sup>	264 ± 18	>400	>400	>400	>400	>400
	60/40	87 ± 4 <sup>a</sup>	44,3 ± 0,3 <sup>d</sup>	>400	>400	>400	>400	>400	>400

\*Letras diferentes em cada linha representam uma diferença estatisticamente significativa, considerando uma significância de 0,05.

\*EC<sub>50</sub>-- Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5

\*GI<sub>50</sub>- Concentração que inibe 50% do crescimento celular

\*IC<sub>50</sub>- Concentração responsável por 50% da atividade

#### **4.4.1.1. Atividade antibacteriana da mistura dos sais da água termal e do extrato da flor de castanheiro**

Os resultados obtidos na atividade antimicrobiana da mistura dos sais da água termal e do extrato de flor de castanheiro estão representados na **Tabela 12**. A avaliação da atividade antibacteriana desta mistura demonstrou que nas diferentes concentrações testadas, a mistura na proporção 20/80 foi a que apresentou melhores resultados, quer para as bactérias gram-positivos quer para as gram-negativos testadas, com resultados de CMI  $\leq 5$  mg/mL, à exceção da *Yersinia enterocolitica* que apresentou uma CMI de 10 mg/mL. No entanto, comparando estes resultados com os ensaios da atividade antibacteriana dos sais da água termal e do extrato da flor de castanheiro, verificou-se que as misturas apresentam CMI relativamente superiores comparativamente à atividade dos sais da água termal e do extrato da flor de castanheiro quando testados de forma isolada nas diferentes espécies de bactérias.

Comparando a ação antimicrobiana da mistura nas diferentes proporções testadas entre si, verificou-se que quanto maior a percentagem dos sais da água termal na mistura, menor a ação destes sobre as bactérias. Este efeito pode estar relacionado ao fato da flor de castanheiro, conforme foi descrito por Carochó et al. (2014b) apresentar efeito antimicrobiano sobre os microrganismos. No entanto, a adição dos sais, pode contribuir para a redução da concentração de compostos fenólicos presentes no extrato, e conseqüentemente, diminuir a ação do extrato sobre os microrganismos.

**Tabela 12.** Atividade antimicrobiana da mistura dos sais da água termal e do extrato da flor de castanheiro.

<b>Sais da água termal / Extrato da Flor de Castanheiro</b>																
	<b>50/50</b>		<b>20/80</b>		<b>80/20</b>		<b>40/60</b>		<b>60/40</b>		<b>Streptomicina 1mg/mL</b>		<b>Meticilina 1mg/mL</b>		<b>Ampicilina 10mg/mL</b>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<b>BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVO</b>																
<i>Enterobacter Cloacae</i>	2,5	>10	2,5	>10	2,5	>10	1,25	>10	10	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	0,15	0,15
<i>Escherichia coli</i>	10	10	5	10	10	10	5	>10	10	10	0,01	0,01	n.t.	n.t.	0,15	0,15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	>10	5	10	5	10	5	>10	10	>10	0,06	0,06	n.t.	n.t.	0,63	0,63
<i>Salmonella enterocolitica</i>	2,5	>10	2,5	>10	10	>10	10	>10	10	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	0,15	0,15
<i>Yersinia enterocolitica</i>	5	>10	10	>10	5	>10	5	>10	5	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	0,15	0,15
<b>BACTÉRIAS GRAM-POSITIVO</b>																
<i>Bacillus cereus</i>	1,25	>10	1,25	>10	5	>10	1,25	>10	1,25	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,5	>10	2,5	10	5	>10	2,5	>10	5	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	0,15	0,15
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,5	10	2,5	10	2,5	10	2,5	10	5	10	0,007	0,007	0,007	0,007	0,15	0,15

#### **4.4.1.2. Atividade antifúngica da mistura dos sais da água termal e do extrato da flor de castanheiro**

Na **Tabela 13.** estão representados os resultados obtidos da avaliação da atividade antifúngica da mistura entre os sais da água termal e o extrato da flor de castanheiro. A avaliação da capacidade antifúngica desta mistura foi feita em *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus fumigatus*. A mistura entre os sais da água termal e o extrato da flor de castanheiro na proporção de 80/20, apresentou uma CMI de 0,6 mg/mL para *A. brasiliensis*. Estes resultados da CMI do sinergismo são mais promissores comparativamente às CMI obtidas para o mesmo microrganismo quando a ação antifúngica dos sais e da flor de castanheiro foi testada de uma forma isolada (10 e 1,25 mg/mL) respectivamente. No entanto, o *A. fumigatus* apresentou valores de CMI iguais ou superiores a 10 mg/mL para o sais da água termal, flor de castanheiro e também para A mistura entre os dois.

**Tabela 13.** Atividade antifúngica da mistura entre os sais da água termal e do extrato da flor de castanheiro

	Sais da água termal / Extrato de Flor de Castanheiro (mg/mL)											
	50/50		20/80		80/20		40/60		60/40		cetoconazole 1mg/mL	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	2,5	10	5	10	0,6	>10	2,5	10	1,25	10	0,06	0,125
<i>Aspergillus fumigatus</i>	10	>10	10	>10	10	>10	10	>10	10	>10	0,5	1

#### 4.4.2. Mistura entre os sais da água termal e do extrato de alecrim

A **Tabela 14**, representa a atividade antioxidante, anti-proliferativa, anti-inflamatória e toxicidade dos sais da água termal com diferentes quantidades de extratos de alecrim. Analisando a tabela é possível destacar que nenhuma das amostras mostrou qualquer tipo de toxicidade para as células PLP2 (fígado de porco), o que assegura o seu consumo em certa medida. É também importante destacar que não foi detetada qualquer tipo de atividade anti-inflamatória.

No que concerne à atividade anti-proliferativa, apenas algumas concentrações mostraram atividade contra linhas tumorais, contudo, nenhuma delas mostrou uma atividade considerável. Os resultados demonstraram que a mistura na proporção (50:50) apresentou ação anti-proliferativa nas linhas celulares de AGS e CaCo2 com valores de  $GI_{50}$  em torno de  $198 \pm 18$  e  $73 \pm 4$   $\mu\text{g/mL}$ , respetivamente. Por outro lado, a mistura na proporção 20:80 evidenciou ação anti-proliferativa nas linhas celulares MCF-7 e NCI-H460 com valores de  $GI_{50}$  iguais a  $244 \pm 3$  e  $182 \pm 14$   $\mu\text{g/mL}$ , respetivamente. A mistura entre os sais da água termal e o extrato de alecrim nas proporções 40:60 e 60:40, evidenciaram ação anti proliferativa para as linhas celulares MCF-7, CaCo2 e NCI-H460, onde a mistura na proporção 40:60 apresentou  $GI_{50}$  de  $187 \pm 18$ ,  $44 \pm 3$ ,  $183 \pm 12$   $\mu\text{g/mL}$ , respetivamente, e, o sinergismo na proporção 60:40 valores obtidos de  $GI_{50}$  foram de  $281 \pm 4$ ,  $94 \pm 1$ ,  $281 \pm 17$   $\mu\text{g/mL}$ , respetivamente.

A avaliação da toxicidade nas PLP2 da mistura entre os sais da água termal e o extrato de alecrim evidenciou que este não era tóxico em todas as proporções testadas, pois apresentou valores de  $GI_{50}$  superiores a 400  $\mu\text{g/mL}$ . No entanto, a avaliação do efeito anti-inflamatório em linhas celulares RAW demonstrou que esta mistura não possuía ação anti-inflamatória tendo apresentado valores de  $IC_{50}$  superiores a 400  $\mu\text{g/mL}$ .

Em relação à atividade antioxidante avaliada em CAA e TBARS, revelou que no primeiro ensaio não foi possível encontrar diferenças significativas entre as concentrações de alecrim nas amostras, enquanto no ensaio de TBARS foi possível verificar diferenças significativas. Uma vez que este ensaio está representado em valores de  $EC_{50}$ , em que o valor mais baixo obtido corresponde à concentração que apresenta melhor atividade antioxidante, foi possível verificar que a amostra na proporção 20/80 apresentou o melhor resultado, seguindo-se a proporção 40/60, enquanto, a amostra na proporção 80/20 foi aquela que apresentou menor atividade. Estes resultados mostram que o alecrim é de facto o extrato que confere a atividade antioxidante a estas misturas.

**Tabela 14.** Bioatividades da mistura dos sais de água termal com o extrato de alecrim

		Atividade antioxidante		Atividade anti-proliferativa (GI <sub>50</sub> , µg/mL)				Toxicidade (GI <sub>50</sub> , µg/mL)	Atividade anti-inflamatória (IC <sub>50</sub> , µg/mL)
		CAA (%)	TBARS (EC <sub>50</sub> ug/mL)	AGS	MCF-7	CaCo2	NCI-H460	PLP2	(EC <sub>50</sub> ug/mL)
<b>Mistura Sais de água termal / extrato de alecrim</b>	50/50	91 ± 6 <sup>a</sup>	9,56 ± 0,03 <sup>c</sup>	198 ± 13	-	73 ± 3 <sup>b</sup>	-	>400	>400
	20/80	85 ± 3 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,05 <sup>a</sup>	-	244 ± 2 <sup>b</sup>	-	185 ± 11 <sup>a</sup>	>400	>400
	80/20	94 ± 7 <sup>a</sup>	38,3 ± 0,02 <sup>d</sup>	-	-	-	-	>400	>400
	40/60	88 ± 3 <sup>a</sup>	8,248 ± 0,002 <sup>b</sup>	-	188 ± 13 <sup>a</sup>	45 ± 2 <sup>a</sup>	186 ± 10 <sup>a</sup>	>400	>400
	60/40	87 ± 2 <sup>a</sup>	9,6 ± 1,1 <sup>c</sup>	-	281 ± 3 <sup>c</sup>	94 ± 0,9 <sup>c</sup>	178 ± 13 <sup>a</sup>	>400	>400

Letras diferentes em cada linha representam uma diferença estatisticamente significativa, considerando uma significância de 0,05.

\*GI<sub>50</sub>, µg/mL- Concentração que inibe 50% do crescimento celular

\* IC<sub>50</sub>, µg/mL- Concentração responsável por 50% da atividade

#### **4.4.2.1. Atividade antibacteriana da mistura dos sais da água termal e do extrato de alecrim**

Na **Tabela 15.** estão representados os resultados da avaliação da atividade antibacteriana das misturas entre os sais da água termal e do extrato de alecrim. A mistura na proporção 20/80 foi aquela que apresentou os resultados mais promissores tendo em conta que a concentração máxima testada tanto nas bactérias Gram-positivo e Gram-negativo apresentou CMI's que variaram entre 0,6 e 5 mg/mL.

Os resultados da atividade antimicrobiana da mistura na proporção 20/80 para a estirpe *Listeria monocytogenes* demonstraram uma CMI de 0,15 mg/mL, valores que são iguais à concentração da ampicilina (0,15mg/mL) que foi um dos antibióticos utilizados como controlo. No entanto, esta CMI obtida na mistura entre os sais da água termal e o extrato de alecrim para a *Listeria monocytogenes* na mistura anteriormente mencionada, difere da CMI obtida no ensaio da atividade antibacteriana do extrato de alecrim frente ao mesmo microrganismo (2,5mg/mL).

Estes resultados do ensaio da atividade antimicrobiana da mistura entre os sais da água termal e o extrato de alecrim, de uma forma geral apresentaram melhores CMI quando comparadas com o ensaio da atividade antibacteriana dos sais da água termal e do extrato de alecrim quando estudados isoladamente. Esta ação antibacteriana relativamente melhorada da mistura, pode estar relacionada ao facto do alecrim possuir capacidade antimicrobiana conforme descrito por Aziz et al. (2021) e o sais da água termal serem compostos minerais que também possuem diferentes efeitos dentre os quais encontramos a sua capacidade antimicrobiana (Cacciapuoti et al., 2020).

**Tabela 15.** Atividade antibacteriana da mistura dos sais da água termal e do extrato de alecrim

Sais da água termal / Extrato de Alecrim																	
	50/50		20/80		80/20		40/60		60/40		Streptomicina 1mg/mL		Metecilina 1mg/mL		Ampicilina 10mg/mL		
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	
<b>BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVO</b>																	
<i>Enterobacter Cloacae</i>	1,25	>10	1,25	>10	2,5	>10	2,5	>10	2,5	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	0,15	0,15	
<i>Escherichia coli</i>	5	>10	5	>10	5	>10	5	>10	5	>10	0,01	0,01	n.t.	n.t.	0,15	0,15	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,5	10	2,5	>10	5	>10	2,5	>10	5	>10	0,06	0,06	n.t.	n.t.	0,63	0,63	
<i>Salmonella enterocolitica</i>	2,5	>10	2,5	>10	5	>10	2,5	>10	2,5	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	0,15	0,15	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	10	>10	1,25	>10	2,5	>10	2,5	>10	2,5	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	0,15	0,15	
<b>BACTÉRIAS GRAM-POSITIVO</b>																	
<i>Bacillus cereus</i>	1,25	>10	0,6	>10	1,25	>10	0,3	>10	1,25	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	
<i>Listeria monocytogenes</i>	1,25	>10	0,15	>10	1,25	>10	0,3	>10	0,6	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	0,15	0,15	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,25	>10	0,6	>10	2,5	>10	0,6	>10	0,6	>10	0,007	0,007	0,007	0,007	0,15	0,15	

\*50/50 -cinquenta por cento dos sais da água termal e cinquenta por cento do extrato de alecrim

\*20/80 -vinte por cento da água termal e oitenta por cento do extrato de alecrim

\*80/20 - oitenta por cento dos sais da água termal e vinte por cento do extrato de alecrim

\*40/60 -quarenta por cento dos sais da água termal e sessenta por cento do extrato de alecrim

\*60/40 -sessenta por cento dos sais da água termal e quarenta por cento do extrato de alecrim

#### **4.2.1.2. Atividade antifúngica da mistura dos sais da água termal e do extrato de alecrim**

Na **Tabela 16**. Estão representados os resultados da avaliação da atividade antifúngica da mistura entre os sais da água termal e o extrato de alecrim em fungos de *A. brasiliensis* e *A. fumigatus*. Os resultados obtidos deste ensaio, demonstraram que para o *A. brasiliensis* obteve-se CMI iguais ou inferiores a 2,5 mg/mL em todas as proporções testadas para este fungo. Dos resultados obtidos resultados, foi possível destacar as CMIs obtidas nas misturas com proporções 80/20 e 60/40 com CMI de 0,6 mg/mL. Os resultados obtidos das misturas, são mais promissores comparativamente às CMI obtidas para os sais da água termal e o extrato de alecrim quando testados isoladamente com valores de 10 e 5 mg/mL, respectivamente neste fungo. Dos resultados obtidos, foi possível verificar para o *A. fumigatus* nas diferentes proporções testadas, foi inibido o seu crescimento em concentrações no intervalo de 5 a 10mg/mL.

**Tabela 16.** Atividade antifúngica da mistura dos sais da água termal e do extrato de alecrim

	Sais da água termal / Extrato de Alecrim (mg/mL)											
	50/50		20/80		80/20		40/60		60/40		Cetoconazole 1mg/mL	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	2,5	10	2,5	10	0,6	10	2,5	10	0,6	10	0,06	0,125
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5	>10	10	>10	5	10	5	>10	5	>10	0,5	1

#### **4.5. Fenóis Totais, conteúdo em minerais e compostos fenólicos presentes nas diferentes misturas.**

##### **4.5.1. Mistura dos sais da água termal e do extrato da flor de castanheiro**

###### **4.5.1.1. Fenóis totais e conteúdo em minerais**

Na **Tabela 17.** estão representados os valores da determinação dos fenóis totais e os minerais presentes nas diferentes proporções das amostras da mistura dos sais da água termal e o extrato da flor de castanheiro.

**Tabela 17.** Conteúdo em fenóis totais e minerais da mistura dos sais da água termal com extrato de flor de castanheiro. Resultados expressos em massa seca.

	Proporção	Fenóis totais (mg/g)	Minerais (mg/100g)					
			K	Na	Mg	Fe	Mn	Cu
<b>Mistura dos sais da água termal / extrato de flor de castanheiro</b>	50/50	7,65 ± 0,01 <sup>c</sup>	2266 ± 89 <sup>b</sup>	16126 ± 4 69 <sup>c</sup>	235 ± 16 <sup>b</sup>	6,2 ± 0,4 <sup>d</sup>	17,2±0,1 <sup>b</sup>	0,34 ± 0,02 <sup>c</sup>
	20/80	13,1 ± 0,1 <sup>e</sup>	1931 ± 96 <sup>a</sup>	7841 ± 377 <sup>a</sup>	207 ± 9 <sup>a</sup>	8,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	28,3±0,7 <sup>a</sup>	0,72±0,07 <sup>a</sup>
	80/20	3,31 ± 0,03 <sup>a</sup>	3081 ± 10 <sup>d</sup>	25515± 109 <sup>e</sup>	365 ± 4 <sup>d</sup>	4,9 ± 0,2 <sup>e</sup>	6,3±0,1 <sup>e</sup>	0,16±0,01 <sup>e</sup>
	40/60	9,33 ± 0,07 <sup>d</sup>	2320 ± 80 <sup>b</sup>	13997 ± 461 <sup>b</sup>	264 ± 1,6 <sup>c</sup>	6,4 ±±0,1 <sup>c</sup>	20,5±0,6 <sup>c</sup>	0,52±0,01 <sup>b</sup>
	60/40	5,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	2781 ± 26 <sup>c</sup>	18608 ± 242 <sup>d</sup>	261 ± 8 <sup>c</sup>	7,4±0,1 <sup>b</sup>	13,3±0,6 <sup>d</sup>	0,24±0,02 <sup>d</sup>

Letras diferentes em cada linha representam uma diferença estatisticamente significativa, considerando uma significância de 0,05.

K- potássio; Na – sódio; Mg - magnésio; Fe – ferro; Mn – manganês; Cu – cobre;

No caso dos fenóis totais, como seria de esperar foi detetada uma maior quantidade de fenóis na amostra com maior volume de solução da flor de castanheiro, enquanto, a menor quantidade foi detetada na amostra com menos volume, visto que os fenóis estão presentes em extratos de plantas e não nos sais da água termal. Relativamente aos minerais, verificou-se exatamente o contrário, as maiores quantidades foram detetadas nas amostras com maior proporção de sais da água termal. Esta tendência foi da mesma forma determinada na quantificação de sódio e magnésio. Relativamente ao ferro, a menor quantidade doseada foi na amostra na proporção de 80/20, verificando-se que a amostra que continha 80% de flor de castanheiro foi a que apresentou valores mais elevados neste mineral e estatisticamente significativos. Esta diferença pode estar relacionada com a presença de maiores níveis de ferro presentes no extrato da flor de castanheiro. Para o manganês e cobre, também a amostra na proporção 80/20 não revelou diferenças estatisticamente significativas, significando menos quantidade destes minerais, e, no caso do manganês, a proporção que mostrou maior quantidade foi a de 20/80, revelando que o maior contribuidor deste elemento seria a flor de castanheiro. Assim como no caso do cobre, a amostra com um valor estatisticamente maior foi a que tinha maior quantidade de flor de castanheiro.

A maior concentração de fenóis totais obtida foi determinada na amostra que continha a maior fração da flor de castanheiro (proporção de 20/80), confirmando o estudo de Carochó et al. (2014b), onde os autores afirmam que a flor de castanheiro apresenta uma grande quantidade de compostos fenólicos e que por sua vez são os responsáveis pelas diversas bioatividades que apresentam. Os resultados obtidos neste estudo, confirmam de certa forma o estudo elaborado por Carochó et al. (2014) que nos seus trabalhos demonstraram que a flor de castanheiro apresenta na sua composição determinados minerais, que pode ter contribuído para maior quantidade de minerais nos sinergismos entre os sais e o extrato da flor de castanheiro.

#### 4.5.1.2. Compostos fenólicos presentes na amostra pura da flor de castanheiro e na mistura na proporção de 20/80

A **Tabela 18.** representa os compostos fenólicos detetados entre a amostra pura de flor de castanheiro e uma mistura na proporção de 20/80 de sais de água termal e da flor de castanheiro.

**Tabela 18.** Conteúdo em compostos fenólicos de extrato puro de flor de castanheiro e misturas de sais da água termal e extrato de flor de castanheiro na proporção 20:80. Resultados expressos em massa seca.

Compostos Fenólicos (mg/mL)	Extrato de flor de castanheiro	Sais da água termal/ extrato da flor de castanheiro (20/80)
Isómero de pedunculagina I (bis-HHDP-glucose)	1,79 ± 0,02*	1,324 ± 0,0006
Isómero de pedunculagina II (bis-HHDP-glucose)	1,68 ± 0,03*	1,363 ± 0,005
Chesnatina	1,488 ± 0,003*	1,33 ± 0,01
Isochesnatina	1,527 ± 0,003*	1,266 ± 0,003
Cretanina	1,386 ± 0,002*	1,208 ± 0,001
Miricetina- <i>O</i> -hexósido	2,5190 ± 0,0008	2,56 ± 0,04
Trigalloil-HHDP-glucósido	1,68 ± 0,07*	1,27 ± 0,08
Isómero de chestanina	3,17 ± 0,03*	1,221 ± 0,002
Quercetina-3- <i>O</i> -glucurónido	0,80 ± 0,03*	0,497 ± 0,001
Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido	0,637 ± 0,002*	0,4770 ± 0,0006
Quercetina- <i>O</i> -hexósido	0,6370 ± 0,0003*	0,476 ± 0,001
Ácido elágico	1,248 ± 0,002	1,24 ± 0,01
Quercetina- <i>O</i> -pentósido	0,557 ± 0,006*	0,4714 ± 0,0009
Quercetina- <i>O</i> -desoxihexósido	0,81 ± 0,02*	0,499 ± 0,003
Isorametina- <i>O</i> -hexósido	0,606 ± 0,003*	0,4852 ± 0,0009
3,3',4-trimetóxi- <i>O</i> -β-D-glucopiranosose de ácido elágico	1,411 ± 0,002*	1,227 ± 0,002
Isorametina- <i>O</i> -acetilhexósido	0,571 ± 0,002*	0,510 ± 0,007
<b>Total de ácido elágico e derivados</b>	<b>15,4 ± 0,2*</b>	<b>11,5 ± 0,1</b>
<b>Total Flavonóides</b>	<b>7,1 ± 0,05*</b>	<b>5,98 ± 0,03</b>
<b>Total Compostos Fenólicos</b>	<b>22,5 ± 0,2*</b>	<b>17,4 ± 0,08</b>

Um asterisco em cada linha representa uma diferença estatisticamente significativa com uma significância de 0,05.

Analisando os resultados obtidos, foi possível verificar que não houve diferenças estatisticamente significativas na concentração determinada de miricetina-*O*-hexósido e de ácido elágico quando comparada a amostra pura e a mistura analisada na proporção de 20/80. Assim, pode-se concluir que a dissolução do extrato de flor de castanheiro reduz a quantidade de compostos fenólicos, o que está patente nas famílias de compostos, onde a

solução pura mostrou uma quantidade estatisticamente superior tanto no total de ácido elágico e derivados como nos flavonóides. Por outro lado, verificou-se que o composto fenólico mais abundante no extrato da flor de castanheiro foi um isômero de chestaina enquanto, na mistura entre os sais da água termal e o extrato da flor de castanheiro foi a miricetina-*O*-hexósido.

#### **4.5.2. Mistura dos sais da água termal e do extrato de alecrim**

##### **4.5.2.1. Fenóis totais e conteúdo em minerais**

Na **Tabela 19**, estão representados os valores da determinação dos fenóis totais e os minerais presentes nas diferentes proporções das amostras da mistura dos sais da água termal e o extrato de alecrim. Analisando os resultados obtidos verificou-se que a amostra na proporção 20/80 revelou a maior concentração de fenóis totais. Este resultado era bastante esperado, pois os fenóis encontram-se apenas presentes no extrato de alecrim, sendo os sais das águas termais isentos destes compostos.

Em relação aos minerais, foi analisado o (K), (Na), (Mg), (Fe), (Mn) e (Cu). Em relação ao potássio, apenas a amostra 80/20 mostrou conter quantidades significativamente maiores que as outras. Em relação ao sódio, as quantidades foram significativamente diferentes em quase todas as amostras, tendencialmente descendo a sua concentração quanto menor a quantidade de água termal, provavelmente sendo esta a maior contribuidora para as suas quantidades. O magnésio mostrou uma tendência semelhante ao potássio, sendo que a maior quantidade foi detetada na amostra 50/50, contudo não mostrando diferenças significativas entre as amostras 50/50 e 80/20, nem entre 40/60 e 60/40. No caso do ferro a maior quantidade foi detetada na amostra 60/40, seguido da amostra 80/20. A menor quantidade foi detetada na amostra 20/80 não mostrando diferenças entre as amostras 40/60 e 60/40. O manganés mostrou uma tendência inversa, pois a menor quantidade foi encontrada na amostra 60/40, com maior quantidade de água termal, sendo a maior quantidade encontrada 50/50. Finalmente, o cobre, um metal de transição, mostrou a maior quantidade na amostra 50/50, revelando que ambas as soluções mostraram quantidades consideráveis de cobre. Assim como os resultados da maior concentração de fenóis totais no sinergismo entre os sais e o extrato de alecrim na proporção (20:80) confirmam a presença de compostos fenólicos no extrato de alecrim que lhe confere diversas bioatividades conforme descrito por (Aziz et al. (2021).

Foi possível verificar que a maior concentração de minerais se encontra nas proporções em que os sais estão em maior quantidade. O sódio foi o mineral encontrado em maior concentração no sinergismo entre os sais e o extrato de alecrim ( $247 \pm 5$ ) g/kg, este fator pode estar relacionado ao fato de ele juntamente com o potássio ele ter sido o mineral encontrado em maior concentração na nossa determinação de minerais, assim como esta concentração de sódio pode ser influenciada pela concentração de sódio encontrada nos extratos de alecrim conforme foi demonstrado por Ribeiro-Santos et al. (2015) onde o sódio foi o mineral encontrado em maior concentração neste extrato.

**Tabela 19.** Conteúdo em fenóis e minerais das misturas de sais da água termal e do extrato de alecrim. Resultados expressos em massa seca.

	Proporção	Fenóis totais (mg/g)	Minerais (mg/100g)					
			K	Na	Mg	Fe	Mn	Cu
<b>Mistura de Sais de água termal / extrato de alecrim</b>	50/50	8,87 ± 0,03 <sup>c</sup>	3077 ± 118 <sup>a</sup>	16012 ± 414 <sup>c</sup>	296 ± 10 <sup>c</sup>	8,3±0,2 <sup>b</sup>	1,06±0,03 <sup>b</sup>	0,428±0,002 <sup>a</sup>
	20/80	12,46 ± 0,03 <sup>e</sup>	3060 ± 24 <sup>b</sup>	8687 ± 203 <sup>a</sup>	206 ± 10 <sup>a</sup>	7,4±0,3 <sup>c</sup>	0,97±0,03 <sup>a</sup>	0,42±0,03 <sup>a</sup>
	80/20	3,554 ± 0,004 <sup>a</sup>	3413 ± 155 <sup>a</sup>	24681 ± 353 <sup>e</sup>	285,6 ± 0,8 <sup>c</sup>	8,6±0,4 <sup>a</sup>	0,67±0,01 <sup>c</sup>	0,026±0,005 <sup>d</sup>
	40/60	10,25 ± 0,06 <sup>d</sup>	3150 ± 19 <sup>a</sup>	14698 ± 380 <sup>b</sup>	257 ± 5 <sup>b</sup>	8,12±0,04 <sup>b</sup>	0,84±0,01 <sup>b</sup>	0,31±0,01 <sup>b</sup>
	60/40	6,93 ± 0,03 <sup>b</sup>	3070 ± 12 <sup>a</sup>	19107 ± 70 <sup>d</sup>	240 ± 5 <sup>b</sup>	9,7±0,1 <sup>b</sup>	0,58±0,03 <sup>d</sup>	0,162±0,005 <sup>c</sup>

K- Potássio; Na – sódio; Mg - magnésio; Fe – ferro; Mn – manganês; Cu – cobre;

Letras diferentes em cada linha representam uma diferença estatisticamente significativa, considerando uma significância de 0,05.

#### 4.5.2.2. Compostos fenólicos presentes na amostra pura de alecrim e na mistura na proporção de 20/80

Na **Tabela 20.** estão representados os compostos fenólicos detetados no extrato de alecrim puro e na mistura dos sais da água termal e do extrato de alecrim na proporção 20/80. De todos os compostos detetados, o mais abundante no extrato de alecrim puro foi o ácido rosmarínico, com uma quantidade significativamente inferior que no extrato 20/80, enquanto o mais abundante no extrato da mistura foi a acetilluteonina-*O*-glucurónido, porém sem diferenças estatisticamente significativas relativamente ao extrato puro de alecrim. Verificou-se que para todos os compostos presentes em ambos os extratos a acetilluteonina-*O*-glucurónido foi o único detetado em concentração superior a de 1 mg/mL na amostra da mistura. No entanto, o extrato puro de alecrim apresentou o ácido rosmarínico, luteolina-3'-*O*-glucorónido e a acetiluteonina-*O*-glucurónido com concentrações superiores a 1 mg/mL, tendo-se verificado que para estes compostos na mistura de 20/80 a concentração diminuiu significativamente. Houve uma considerável diminuição da concentração em compostos fenólicos da amostra com extrato puro para a amostra da mistura, havendo, contudo, casos em que alguns apresentaram um aumento. Desta forma, foi possível observar que os minerais presentes nos sais da água termal tendem por um lado a decompor alguns compostos e por outro a preservá-los. Ainda assim, considerando as famílias de compostos fenólicos, tanto ácidos fenólicos como flavonóides totais, a amostra pura de alecrim mostrou uma quantidade significativamente maior, o que se traduziu também numa maior quantidade em compostos fenólicos totais.

**Tabela 20.** Conteúdo em compostos fenólicos da mistura de sais da água termal e do extrato de alecrim. Resultados expressos em massa seca.

<b>Compostos Fenólicos (mg/mL)</b>	<b>Extrato de Alecrim</b>	<b>Sais: extrato de alecrim (20/80)</b>
Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	0,408 ± 0,004	0,49 ± 0,02
Ácido cafeico	0,0017 ± 0,0003*	0,00096 ± 0,00004
Hexósido eriodictiol	0,072 ± 0,003*	0,0163 ± 0,0005
Ácido litospérmico A	0,433 ± 0,002*	0,45 ± 0,01
Hexósido de ácido rosmarínico	0,571 ± 0,003	0,56 ± 0,01
Rutinósido de isoramantina-3- <i>O</i> ramnosil	0,582 ± 0,001*	0,59 ± 0,01
Quercetina- <i>O</i> -glucoronídeo	0,6289 ± 0,0004*	0,58 ± 0,02
Luteolina- <i>O</i> -glucoronídeo	0,75 ± 0,02*	0,952 ± 0,008
Kaempferol- <i>O</i> - hexoside	0,599 ± 0,002	0,595 ± 0,008
Ácido salvianólico B	0,815 ± 0,002*	0,500 ± 0,007
Isoramantina-3- <i>O</i> -rutinósido	0,559 ± 0,001	0,55 ± 0,01
Ácido rosmarínico	6,2 ± 0,4*	0,52 ± 0,01
Luteolina-3'- <i>O</i> -glucoronídeo	1,268 ± 0,004*	0,643 ± 0,003
Ácido salvianólico A	0,541 ± 0,002*	0,62 ± 0,02
Acetiluteonina- <i>O</i> -glucuronídeo	1,318 ± 0,005	1,317 ± 0,005
<b>Ácidos Fenólicos Totais</b>	9,0 ± 0,4*	3,15 ± 0,05
<b>Flavonóides Totais</b>	5,77 ± 0,03*	5,25 ± 0,03
<b>Total Compostos Fenólicos</b>	14,8 ± 0,4*	8,40 ± 0,04

Um asterisco em cada linha representa uma diferença estatisticamente significativa, considerando uma significância de 0,05.

## 4.6. Avaliação dos sumos desenvolvidos

### 4.6.1. Açúcares livres e minerais

Na **Tabela 21**, estão representados os açúcares livres e os minerais detetados nos vários sumos. O Sumo A continha extrato de flor de castanheiro (20:80) e sais da água termal, o Sumo B continha extrato de alecrim (20:80) e sais da água termal, e o Sumo C não continha aditivos. A representação da **Tabela 21**, segue uma análise dos dois fatores, tempo de prateleira (TP) e tipo de incorporação (TI), de forma independente para que se consiga entender melhor os efeitos de cada um dos fatores nos resultados obtidos, ou, se porventura, houve uma interação entre ambos. Assim, a parte superior da tabela representa a passagem do tempo, mas incluído em cada um dos dias em análise estão todos os tipos de sumos. Na parte inferior, para cada tipo de sumo, estão incluídos os três tipos de análise. Quando cada um dos fatores foi analisado independentemente ( $p$ -value TP x TI > 0,05), a classificação é feita recorrendo a testes *post-hoc* (teste de Tukey ou TahmaneT2), contudo, quando  $p$ -value TP x TI < 0,05 então, para alguns casos apenas algumas tendências puderam ser obtidas pelas médias marginais estimadas (MME).

Analisando a tabela, verifica-se que foram detetados 3 açúcares livres, nomeadamente a frutose, glucose e sacarose, sendo que o mais abundante foi a frutose, seguido da sacarose. Em todos eles houve interação significativa para os dois fatores, sendo que apenas algumas tendências puderam ser extraídas das MME. Assim, através da **Figura 25**, foi possível observar que o sumo com extrato da flor de castanheiro apresentava maior quantidade de frutose relativamente ao sumo com extrato de alecrim. Por outro lado, o sumo C (sem qualquer adição de extrato) mostrou uma tendência decrescente em relação a este açúcar ao longo do tempo, enquanto, no sumo A e no sumo B a frutose baixou durante os primeiros 3 dias, tendo posteriormente estabilizado. No que diz respeito aos açúcares totais, foi o sumo A aquele que apresentou a maior quantidade verificando-se que no sumo C houve um decréscimo na quantidade de açúcares totais presentes.

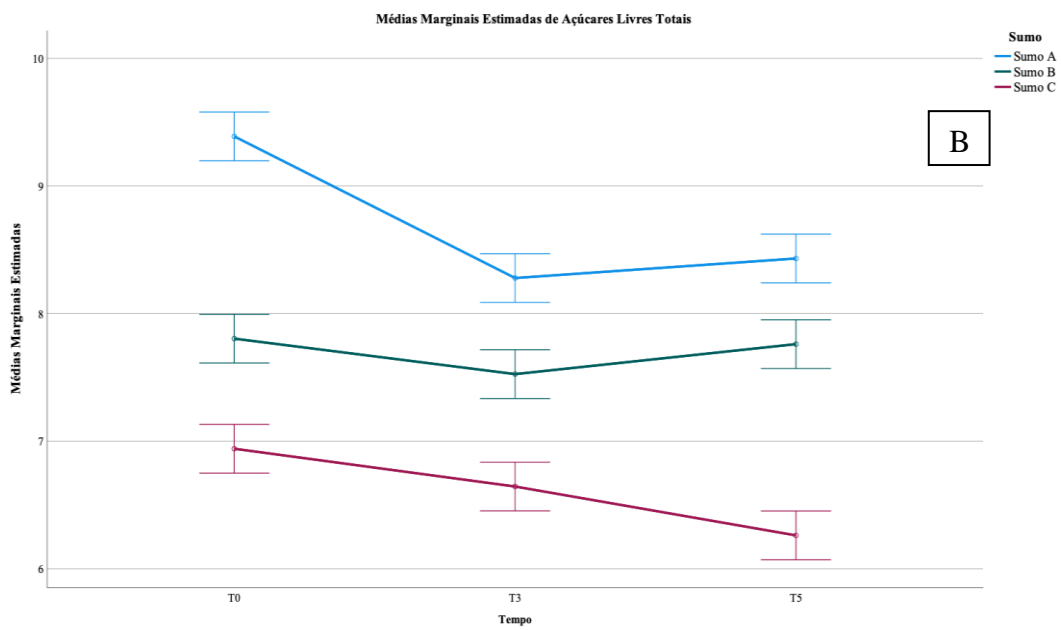
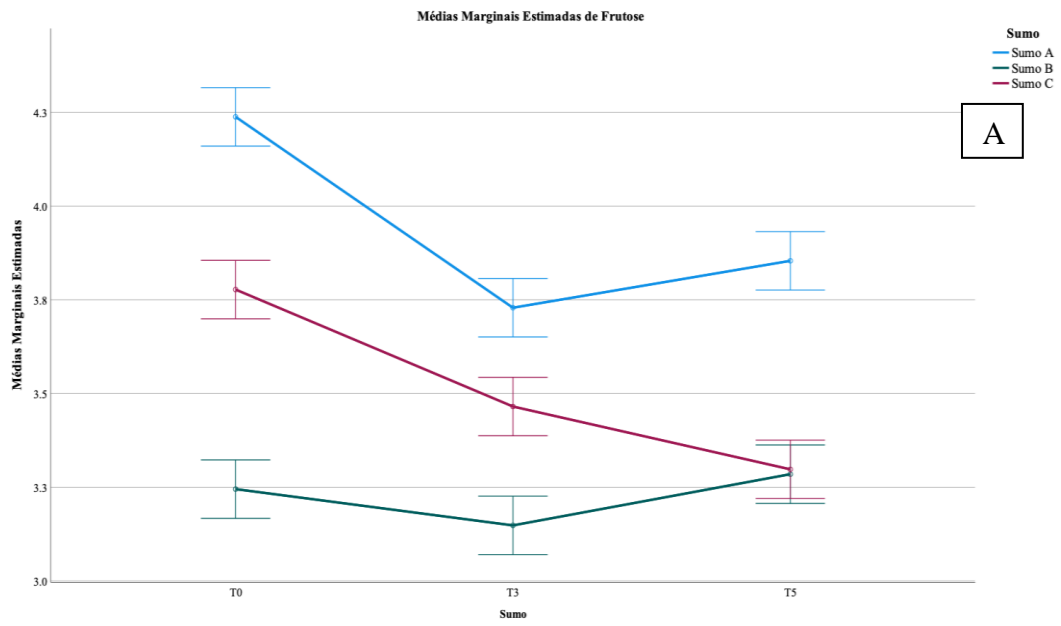
Em relação aos minerais dos sumos, foram detetados 6 elementos, nomeadamente K, Na, Mg, Fe, Mn e Cu. O elemento mais abundante nos sumos foi o K, seguido do Mg, verificando-se que Cu foi o menos abundante. Em todos eles foi encontrada uma interação significativa e apenas se conseguiram encontrar médias marginais estimadas para o Na e para o Mg. Assim, na **Figura 26**, foi possível ver que o Na apenas estava presente nos sumos A e B, sendo o valor no sumo sem sais da água termal igual a zero. No caso do Mg houve uma semelhança, onde este elemento existe em maior quantidade nos sumos com

extratos naturais e em pouca quantidade nos sumos sem aditivos. A variação ao longo do tempo foi, como era de esperar, negligenciável, sendo as variações devido a uma pouca homogeneidade da amostra ou erros no equipamento de leitura.

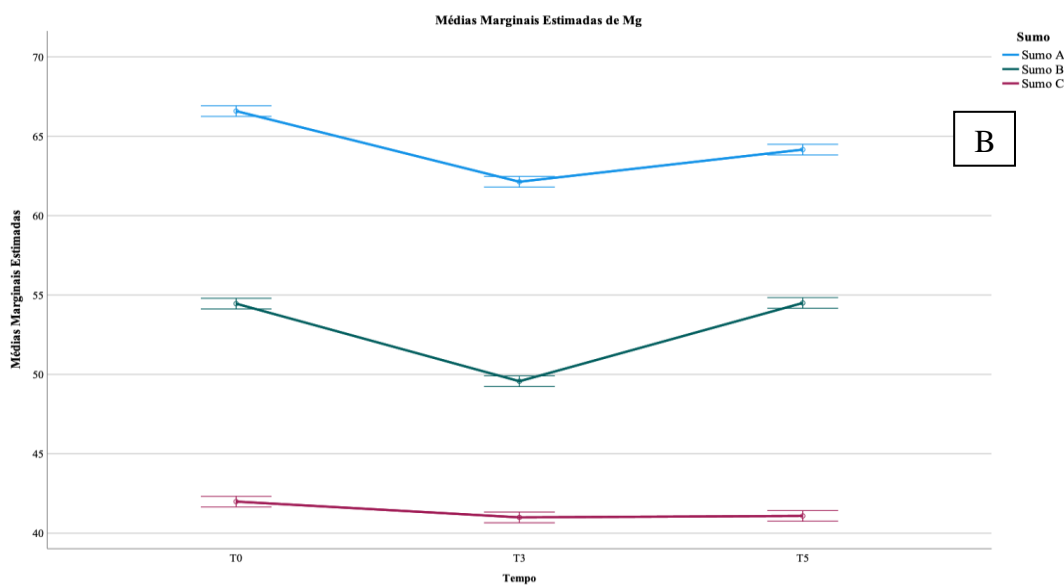
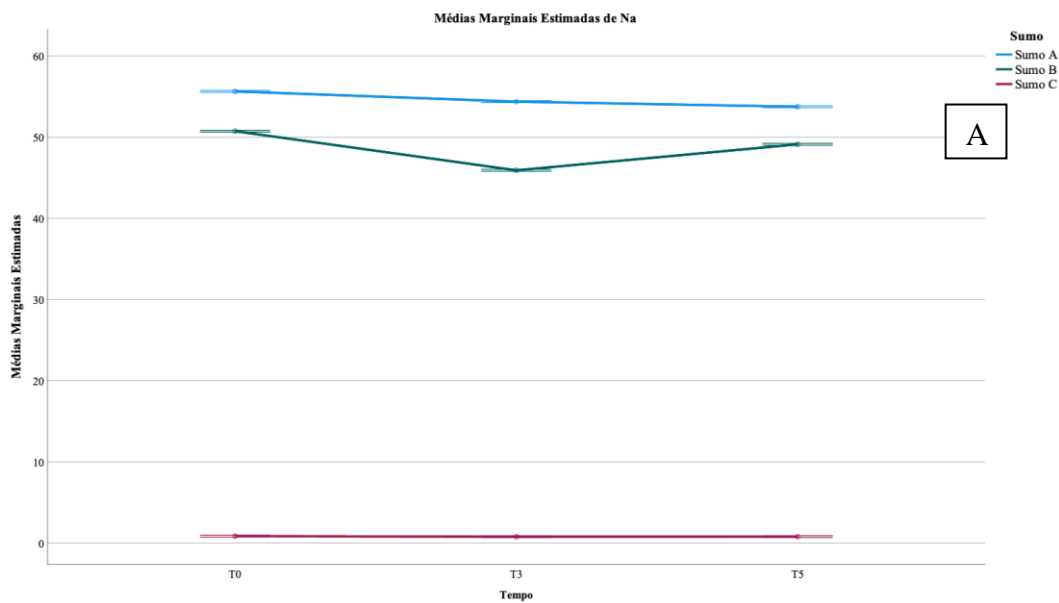
**Tabela 21.** Composição em açúcares e conteúdo mineral dos sumos ao longo de 5 dias. Resultados expressos em massa fresca.

		Açúcares				Minerais (mg/100g)					
		Frutose	Glucose	Sacarose	Total	K	Na	Mg	Fe	Mn	Cu
<b>Tempo de Prateleira (TP)</b>	0 Dias	3,8 ± 0,4	1,5 ± 0,1	2,7 ± 0,9	8 ± 1	91 ± 13	36 ± 26	54 ± 11	0,5 ± 0,1	0,11 ± 0,09	0,04 ± 0,02
	3 Dias	3,4 ± 0,3	1,5 ± 0,1	2,5 ± 0,7	7,4 ± 0,7	87 ± 10	34 ± 25	51 ± 9	0,5 ± 0,2	0,11 ± 0,08	0,030 ± 0,004
	5 Dias	3,5 ± 0,3	1,47 ± 0,07	2,5 ± 0,8	7 ± 1	91 ± 16	35 ± 25	53 ± 10	0,7 ± 0,2	0,12 ± 0,09	0,048 ± 0,006
<b>p-value (n=9)</b>	Teste <i>post-hoc</i>	< 0,001	0,002	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<b>Tipo de Incorporação (TI)</b>	Sumo A	3,9 ± 0,2	1,57 ± 0,07	3,2 ± 0,02	8,7 ± 0,5	99 ± 2	54,6 ± 0,8	64 ± 2	0,4 ± 0,2	0,23 ± 0,01	0,04 ± 0,01
	Sumo B	3,23 ± 0,01	1,36 ± 0,06	3,1 ± 0,1	7,7 ± 0,3	98 ± 6	49 ± 2	53 ± 2	0,6 ± 0,2	0,06 ± 0,02	0,04 ± 0,01
	Sumo C	3,5 ± 0,2	1,57 ± 0,06	1,53 ± 0,07	6,6 ± 0,3	72 ± 2	0,82 ± 0,03	41 ± 0,5	0,7 ± 0,1	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01
<b>p-value (n=9)</b>	Teste <i>post-hoc</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<b>TP×TI (n=27)</b>	<i>p-value</i>	< 0,001	0,002	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

O desvio padrão foi obtido de amostras em diferentes condições e não deve ser por isso encarado como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de variância.



**Figura 25.** Médias marginais estimadas de frutose (A) e açúcares livres totais (B)



**Figura 26.** Médias marginais estimadas de Na (A) e Mg (B).

#### 4.6.2. Composição centesimal

Na **Tabela 22**, encontra-se representada a composição centesimal dos sumos, onde é notório que a humidade (água) é o nutriente mais abundante, seguido dos hidratos de carbono (açúcares e fibras). Considerando os três sumos, no caso da humidade, o sumo C, sem qualquer extrato adicionado, apresentou a maior quantidade de água comparativamente aos sumos A e B. Relativamente aos lípidos foi detetada uma diferença significativa, sendo que não se conseguiram classificar as diferenças, mostrando que tanto

o tempo como a incorporação dos extratos foram significantes na indução das diferenças. No caso das proteínas o tempo pareceu ter uma importância superior às incorporações, mostrando que as proteínas aumentaram dos 0 aos 3 dias e depois voltaram a descer. Esta variação é mínima e pode estar relacionada com uma má homogeneidade das amostras. No caso dos hidratos de carbono, foi possível classificar os valores para ambos os fatores, sendo que ao longo do tempo os hidratos de carbono diminuíram, mostrando diferenças significativas entre o terceiro e o quinto dia. No que respeita às incorporações para os hidratos de carbono, não se verificaram diferenças significativas entre os três tipos de sumo.

**Tabela 22.** Composição centesimal dos sumos desenvolvidos com incorporação dos sais da água termal (g/100g massa fresca)

		<b>Humidade</b>	<b>Lípidos</b>	<b>Cinzas</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Hidratos de Carbono</b>	<b>Energia (Kcal)</b>
<b>Tempo de Prateleira (TP)</b>	0 Dias	91 ± 1	0,05 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,56 ± 0,03 <sup>b</sup>	8,6 ± 0,2 <sup>b</sup>	37,0 ± 0,7 <sup>b</sup>
	3 Dias	91 ± 1	0,05 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,63 ± 0,04 <sup>c</sup>	8,7 ± 0,3 <sup>b</sup>	38 ± 1 <sup>b</sup>
	5 Dias	91 ± 1	0,044 ± 0,009	0,13 ± 0,02	0,43 ± 0,09 <sup>a</sup>	6,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	28,1 ± 0,1 <sup>a</sup>
<b>p-value (n=9)</b>	Teste <i>post-hoc</i>	0,354	0,009	0,288	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<b>Tipo de Incorporação (TI)</b>	Sumo A	90,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,040 ± 0,008	0,143 ± 0,002	0,57 ± 0,09	8 ± 1 <sup>a</sup>	35 ± 5
	Sumo B	90,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,01	0,144 ± 0,004	0,54 ± 0,08	7,9 ± 0,9 <sup>a</sup>	34 ± 4
	Sumo C	92,8 ± 0,3 <sup>b</sup>	0,043 ± 0,007	0,106 ± 0,002	0,52 ± 0,08	8 ± 1 <sup>a</sup>	35 ± 5
<b>p-value (n=9)</b>	Teste <i>post-hoc</i>	<0,001	<0,001	<0,001	< 0,001	0,302	0,188
<b>TP×TI (n=27)</b>	<i>p-value</i>	0,201	0,001	0,019	0,310	0,054	0,134

Em cada linha, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas com uma significância de 0.05. O desvio padrão foi obtido de amostras em diferentes condições e não deve ser por isso encarado como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de variância.

#### 4.6.3. Propriedades físicas e químicas

Na **Tabela 23**, encontram-se representadas a atividade da água ( $A_w$ ), o pH, a viscosidade e cor dos sumos desenvolvidos neste trabalho. No caso da  $A_w$  e do pH foram detetadas interações significativas, o que apenas permitiu classificar o pH através das MME (**Figura 27 A.**). Assim, foi possível verificar que no caso do sumo com flor de castanheiro o valor do pH obtido foi de 7,5, para o sumo com alecrim o valor do pH foi de 8 e o sumo sem adição de extrato o valor do pH foi de 5, mostrando que os extratos tiveram um efeito alcalino nos sumos. Por outro lado, o efeito do tempo não mostrou alterações significativas nos valores obtidos para o pH. Em relação às dimensões físicas (% de tensão de cisalhamento e viscosidade) verificou-se que em todas houve uma interação significativa entre elas, mas não foi possível obter tendências nas MME.

Finalmente em relação à cor dos sumos, nas coordenadas de luminosidade ( $L^*$ ) houve uma interação significativa, mas pelas MME (**Figura 27 B.**) foi possível verificar que o sumo com extrato de alecrim foi o mais claro, mas com o passar do tempo a luminosidade foi-se perdendo, o que o aproximou da cor dos outros dois sumos. O sumo com extrato da flor de castanheiro aumentou a  $L^*$  nos primeiros 3 dias, baixando posteriormente no quinto dia. Em relação às outras coordenadas, cor vermelho-verde e azul-amarelo ( $a^*$  e  $b^*$ , respetivamente), foi possível verificar que o tempo não causou diferenças significativas nestas coordenadas, porém nos sumos em que foram adicionados os diferentes extratos foi possível verificar diferenças entre eles. No caso da coordenada  $a^*$  verificou-se diferenças significativas nas três amostras, mostrando que os sumos com incorporação de extratos tendem a ter um enviesamento para o verde, sendo que o sumo com extrato de alecrim foi aquele que mais tendeu para essa cor. Por outro lado, nas coordenadas  $b^*$ , não se verificou diferenças significativas entre o sumo C (sem extratos) e o sumo B (com extrato de alecrim), enquanto o sumo A, com extrato da flor de castanheiro, a tendência observada foi para a tonalidade azul.

**Tabela 23.** Atividade da água, pH, Viscosidade e cor dos sumos

		aW	pH	%	Tensão de Cisalhamento	Viscosidade	L*	a*	b*
<b>Tempo de Prateleira (TP)</b>	0 Dias	0,979 ± 0,003	7 ± 1	62 ± 5	4399 ± 353	29 ± 2	29 ± 3	11 ± 2 <sup>a</sup>	18 ± 2 <sup>a</sup>
	3 Dias	0,996 ± 0,001	7 ± 1	54 ± 6	3853 ± 437	26 ± 3	26 ± 1	11 ± 3 <sup>a</sup>	18 ± 2 <sup>a</sup>
	5 Dias	0,995 ± 0,001	7 ± 1	52 ± 4	3725 ± 310	25 ± 2	27 ± 1	10 ± 2 <sup>a</sup>	17 ± 1 <sup>a</sup>
<b>p-value (n=9)</b>	Teste <i>post-hoc</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,031	0,043
<b>Tipo de Incorporação (TI)</b>	Sumo A	0,989 ± 0,009	7,37 ± 0,04	58 ± 3	4179 ± 186	28 ± 1	26 ± 1	11,3 ± 0,7 <sup>b</sup>	16,0 ± 0,7 <sup>a</sup>
	Sumo B	0,989 ± 0,008	8,09 ± 0,06	56 ± 8	4020 ± 610	27 ± 4	29 ± 2	8 ± 1 <sup>a</sup>	19 ± 1 <sup>b</sup>
	Sumo C	0,990 ± 0,006	5,22 ± 0,02	53 ± 6	3778 ± 450	25 ± 3	27,6 ± 0,3	13,4 ± 0,8 <sup>c</sup>	18,3 ± 0,6 <sup>b</sup>
<b>p-value (n=9)</b>	Teste <i>post-hoc</i>	0,100	< 0,001	0,10	0,008	0,006	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<b>ST×TI (n=27)</b>	<i>p-value</i>	< 0,001	< 0,001	0,002	0,002	0,002	< 0,001	0,831	0,599

Em cada linha, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas com uma significância de 0.05. O desvio padrão foi obtido de amostras em diferentes condições e não deve ser por isso encarado como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de variância.

Aw-atividade da água

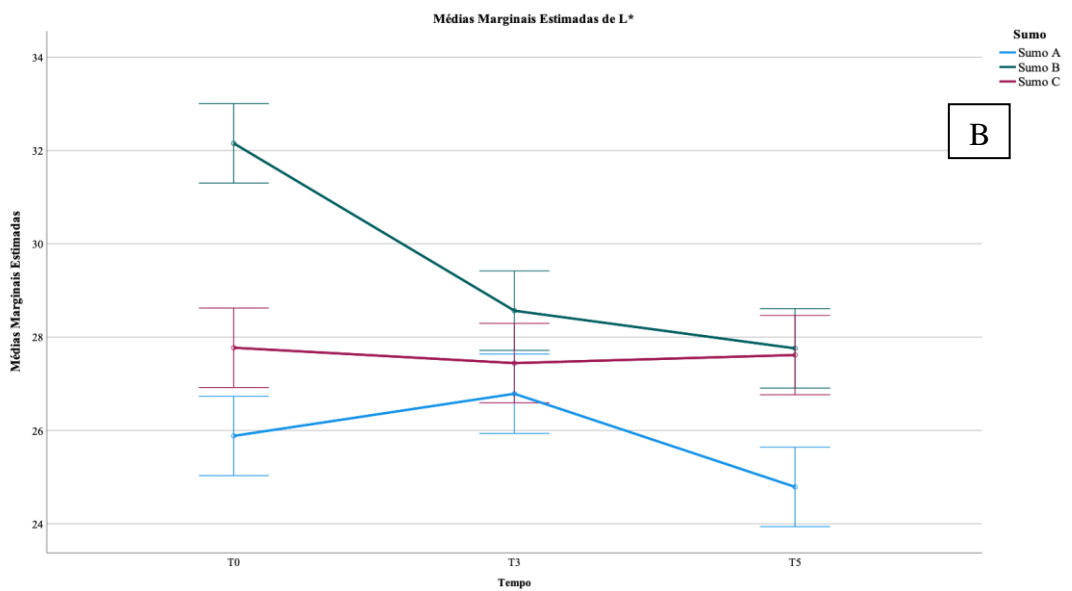
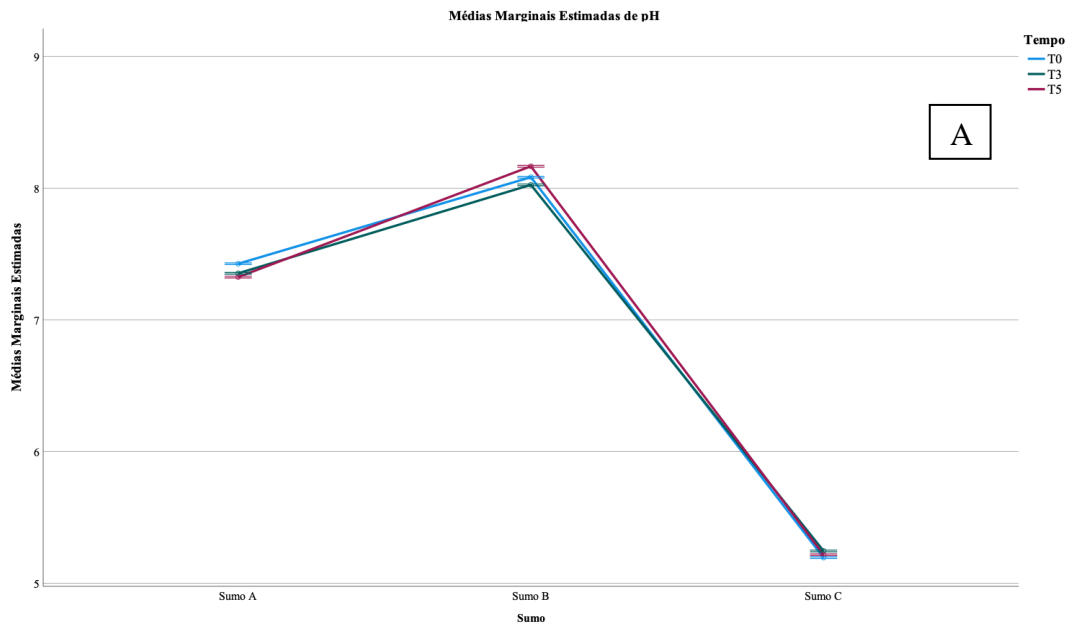
pH-potencial. Hidrogeniônico

%- Percentagem

L\*- Grau de luminosidade

a\*- Cromaticidade vermelho/verde

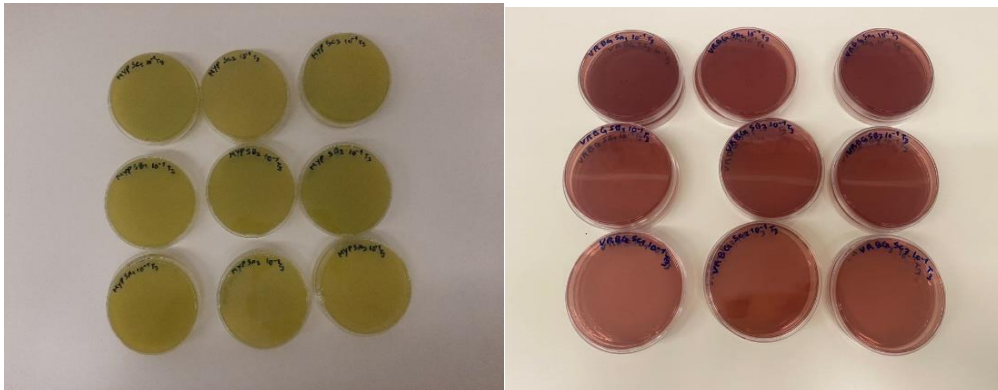
b\*- Cromaticidade azul/amarelo



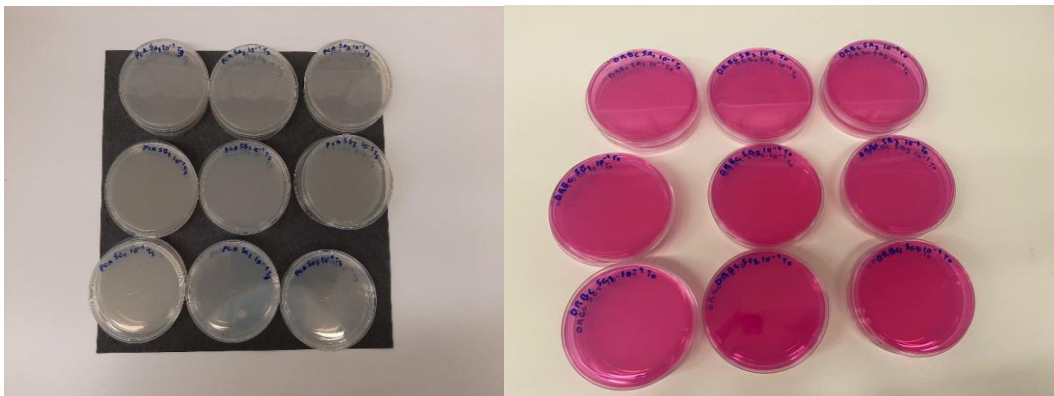
**Figura 27.** Médias marginais estimadas dos sumos para pH (A) e L\* (B).

#### 4.6.4. Avaliação da carga microbiana

Na avaliação da carga microbiana dos sumos contendo os ingredientes A, B e C não evidenciou crescimento microbiano para os microrganismos testados nos tempos em que foi efetuado o ensaio conforme ilustram as **Figuras 28.** e **29.** Este resultado é satisfatório, pois comprova que os extratos adicionados não proporcionam o crescimento de agentes contaminantes de alimentos.



**Figura 28.** Carga microbiana MYP e VRBG



**Figura 29.** Carga microbiana PCA e DRBC

## **5. Considerações Finais**

A presente dissertação permitiu, não só caracterizar quimicamente os sais da água termal, os extratos da flor de castanheiro, o extrato de alecrim e as misturas obtidas entre eles, mas também avaliar as suas propriedades bioativas, o que possibilitou averiguar qual a mistura entre os sais da água termal e os diferentes extratos testados que poderiam apresentar um efeito antioxidante e antimicrobiano com potencial conservante natural.

Quanto à avaliação das bioatividades dos sais da água termal, da flor de castanheiro e do alecrim, estas foram realizadas através da avaliação do potencial antioxidante, antimicrobiano, citotóxico e anti-inflamatório. Os extratos da flor de castanheiro e de alecrim, revelaram ter capacidade antioxidante, bem como atividade antimicrobiana, o que pode estar relacionado com a presença de compostos fenólicos na composição destes. No entanto, os sais da água termal não revelaram ação anti-proliferativa nas linhas celulares tumorais testadas diferentemente dos extratos da flor de castanheiro e alecrim. Os sais da água termal não demonstraram toxicidade perante a linha não-tumoral (PLP2). Tanto os sais da água termal como os extratos da flor de castanheiro e o extrato de alecrim não demonstraram ação anti-inflamatória nas condições testadas.

Relativamente à atividade antimicrobiana, os sais da água termal demonstraram possuir ação antimicrobiana em algumas bactérias gram-positivo e gram-negativo, mas não em concentrações inferiores aos antibióticos testados como grupo controlo, diferente dos extratos da flor de castanheiro e do extrato do alecrim que demonstram ação antimicrobiana sobre as bactérias a baixas concentrações.

As misturas entre os sais da água termal e os extratos de alecrim, quando avaliados em termos de hepatotoxicidade, não evidenciaram nenhum efeito tóxico nas linhas celulares testadas.

A determinação de minerais na água termal, demonstrou que elas eram fortemente ricas em sódio e potássio, apresentando outros minerais em menores concentrações.

As formulações mais promissoras foram incorporadas em sumo de melancia e avaliadas durante um período de 5 dias. Após análise dos sumos resultantes, não se verificou diferenças significativas nos parâmetros organoléticos dos sumos comparativamente com o controlo. Desta forma existe a necessidade de aumentar a análise durante um período mais longo, uma vez que no período testado não foi possível averiguar o efeito conservante dos extratos selecionados.

No entanto, foi possível obter um produto inovador, enriquecido em minerais provenientes da água termal, tornando-o num produto funcional, o que se traduz numa mais-valia para a indústria alimentar.

## **6.Referências bibliográficas**

## Referências bibliográficas

- Afshar, M., Najafian, S., & Radi, M. (2021). Seasonal variation on the major bioactive compounds: total phenolic and flavonoids contents, and antioxidant activity of rosemary from shiraz. *Natural Product Research*, 0(0), 1–6.
- Alaya, I. Ben, Pereira, E., Dias, M. I., Pinela, J., Calhelha, R. C., Soković, M., Kostić, M., Prieto, M. A., Essid, F., Caleja, C., Ferreira, I. C. F. R., & Barros, L. (2021). Development of a natural preservative from chestnut flowers: Ultrasound-assisted extraction optimization and functionality assessment. *Chemosensors*, 9(6), 1–19.
- Amaral, G. P., Mizdal, C. R., Stefanello, S. T., Mendez, A. S. L., Puntel, R. L., de Campos, M. M. A., Soares, F. A. A., & Fachinetto, R. (2019). Antibacterial and antioxidant effects of *Rosmarinus officinalis* L. extract and its fractions. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 9(4), 383–392.
- Andrade, M. A., Ribeiro-Santos, R., Costa Bonito, M. C., Saraiva, M., & Sanches-Silva, A. (2018). Characterization of rosemary and thyme extracts for incorporation into a whey protein based film. *Future Sci. OA*, 92, 497–508.
- Araujo, A. R. T. S., Paiva, T., Ribeiro, M. P., & Coutinho, P. (2015). Innovation in thermalism: An example in beira interior region of Portugal. In *Health and Wellness Tourism: Emergence of a New Market Segment* (pp. 165–180). Springer International Publishing.
- Araujo, A. R. T. S., Rodrigues, M., Ribeiro, M. P., & Coutinho, P. (2017). *Thermal Cosmetics as Therapeutic Adjuvant for Dermatological Disorders*. *Environ Geochem Health*, 1–3.
- Araujo, A. R. T. S., Sarraguça, M. C., Ribeiro, M. P., & Coutinho, P. (2017). Physicochemical fingerprinting of thermal waters of Beira Interior region of Portugal. *Environmental Geochemistry and Health*, 39(3), 483–496.
- Araújo, S. G., Lima, W. G., Amaral Pinto, M. E., Morais, M. Í., Pereira de Sá, N., Johann, S., Rosa, C. A., & Alves Rodrigues dos Santos Lima, L. (2019). Pharmacological prospection in-vitro of Lamiaceae species against human pathogenic fungi associated to invasive infections. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21.
- Aziz, E., Batool, R., Akhtar, W., Shahzad, T., Malik, A., Shah, M. A., Iqbal, S., Rauf, A., Zengin, G., Bouyahya, A., Rebezov, M., Dutta, N., Khan, M. U., Khayrullin, M., Babaeva, M., Goncharov, A., Shariati, M. A., & Thiruvengadam, M. (2021). Rosemary species: a review of phytochemicals, bioactivities and industrial applications. *South African Journal of Botany*, 000.

- Barros, L., Oliveira, S., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). In vitro antioxidant properties and characterization in nutrients and phytochemicals of six medicinal plants from the Portuguese folk medicine. *Industrial Crops & Products*, 32(3), 572–579.
- Barros, L., Pereira, E., Calhela, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1732–1740.
- Beltra, A., & Roncale, P. (2002). Ability of a -tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C , to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. 76, 407–415.
- Bruna, G. O. L., Thais, A. C. C., & Lúcia, A. C. C. (2018). Food additives and their health effects: A review on preservative sodium benzoate. *African Journal of Biotechnology*, 17(10), 306–310.
- Cacciapuoti, S., Luciano, M. A., Megna, M., Annunziata, M. C., Napolitano, M., Patruno, C., Scala, E., Colicchio, R., Pagliuca, C., Salvatore, P., & Fabbrocini, G. (2020). The role of thermal water in chronic skin diseases management: A review of the literature. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 9, Issue 9, pp. 1–19). MDPI.
- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A. L., Caroch, M., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Fortification of yogurts with different antioxidant preservatives: A comparative study between natural and synthetic additives. *Food Chemistry*, 210, 262–268.
- Caleja, C., Barros, L., Prieto, M. A., Bento, A., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Development of a natural preservative obtained from male chestnut flowers: Optimization of a heat-assisted extraction technique. *Food and Function*, 10(3), 1352–1363.
- Caroch, M., Barreira, J. C. M., Antonio, A. L., Bento, A., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). The incorporation of plant materials in “Serra da Estrela” cheese improves antioxidant activity without changing the fatty acid profile and visual appearance. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(10), 1607
- Caroch, M., Barreira, J. C. M., Bento, A., Fernández-Ruiz, V., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Chestnut and lemon balm based ingredients as natural preserving

- agents of the nutritional profile in matured “serra da Estrela” cheese. *Food Chemistry*, 204, 185–193.
- Carocho, M., Barreira, J. C. M., Bento, A., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Chestnut flowers as functionalizing agents to enhance the antioxidant properties of highly appreciated traditional pastry. *Food and Function*, 5(11), 2989–2995.
- Carocho, M., Barros, L., Bento, A., Santos-Buelga, C., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). *Castanea sativa* mill. Flowers amongst the most powerful antioxidant matrices: A phytochemical approach in decoctions and infusions. *BioMed Research International*, 2014.
- Carocho, M., Calhella, R. C., Queiroz, M. J. R. P., Bento, A., Morales, P., Soković, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2014b). Infusions and decoctions of *Castanea sativa* flowers as effective antitumor and antimicrobial matrices. *Industrial Crops and Products*, 62, 42–46.
- Carocho, M., Heleno, S., Rodrigues, P., Barreiro, M. F., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). A novel natural coating for food preservation: Effectiveness on microbial growth and physicochemical parameters. *Lwt*, 104(January), 76–83.
- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 71, pp. 107–120). Elsevier Ltd.
- Carocho, Márcio Barreiro, Maria Filomena Morales, Patricia Ferreira, I. C. F. R. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 377–399.
- Carrubba, A., Abbate, L., Sarno, M., Sunseri, F., Mauceri, A., Lupini, A., & Mercati, F. (2020). Characterization of Sicilian rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) germplasm through a multidisciplinary approach. *Planta*, 251(2), 1–15.
- Chau, N. D., Wątor, K., Rusiniak, P., Gorczyca, Z., & Van Hao, D. (2022). Chemical composition, radioactive and stable isotopes in several selected thermal waters in North Vietnam. *Ecological Indicators*, 138(April).
- Chen, X., Ding, Y., Forrest, B., Oh, J., Bousset, S. M., & Hamann, M. T. (2019). Lemon yellow # 15 a new highly stable , water soluble food colorant from the peel of *Citrus limon*. *Food Chemistry*, 270(July 2018), 251–256.

- Chongtham, N., Bisht, M. S., Santosh, O., Bajwa, H. K., & Indira, A. (2021). Mineral elements in Bamboo shoots and Potential role in Food Fortification. In *Journal of Food Composition and Analysis* (Vol. 95). Academic Press Inc.
- Costantino, M., Izzo, V., Conti, V., Manzo, V., Guida, A., & Filippelli, A. (2020). Journal of Traditional and Complementary Medicine Sulphate mineral waters: A medical resource in several disorders. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*, 10(4), 320–326.
- de Araújo, F. F., de Paulo Farias, D., Neri-Numa, I. A., & Pastore, G. M. (2021). Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chemistry*, 338(July 2020), 127535.
- EFSA. European Food Safety Authority. Regulation (EU) No 231/2012. Disponível em: <https://eurlex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R0231&from=EN>. Acesso em: 02 de novembro de 2020.
- Felten, A., Diolinda, D., Pozzada, J., & Fernanda, J. (2022). Trends in Food Science & Technology Phenolic compounds from coffee by-products: Extraction and application in the food and pharmaceutical industries. *Trends in Food Science & Technology*, 123(March), 172–186.
- Fernandes, F. A., Caroch, M., Heleno, S. A., Rodrigues, P., Dias, M. I., Pinela, J., Prieto, M. A., Simal-Gandara, J., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2020). *Effect of Natural Preservatives on the Nutritional Profile, Chemical Composition, Bioactivity and Stability of a Nutraceutical Preparation of Aloe arborescens*. *Antioxidants*, 9(4), 281.
- Ferreira, M., Azevedo, B. M., Luccas, V., & Andr, H. M. (2017). Sensory Profile and Consumer Acceptability of Prebiotic White Chocolate with Sucrose Substitutes and the Addition of Goji Berry (*Lycium barbarum* ). *Trends in Food Science & Technolog* 82(3).
- Fromentin, E., Flanagan, J., Roller, M., Tom, F. A., & Esp, J. C. (2013). Bioavailability of the major bioactive diterpenoids in a rosemary extract: Metabolic profile in the intestine , liver , plasma , and brain of Zucker rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 1834–1846.
- Gharibzahedi, S. M. T., & Jafari, S. M. (2017). The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 62, pp. 119–132).

- Gonçalves, G. A., Corrêa, R. C. G., Barros, L., Dias, M. I., Calhelha, R. C., Correa, V. G., Bracht, A., Peralta, R. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Effects of in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation on a rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract rich in rosmarinic acid. *Food Chemistry*, 271, 393–400.
- Gospel, C., Rachael, C., Ulunma, O., Christian, C., Ogechi, C., Uzoamaka, F., & Gabriel, C. (2020). Assessment of trace metals contamination on soil from abandoned artisanal tin mining paddock in barkin-ladi area of plateau state. / *Www.Ijaar. Org Journal International Journal of Advanced Academic Research*, ISSN (11), 2488–9849.
- Hamidzadeh, N., Simaetabar, S., Handjani, F., Ranjbar, S., Moghadam, M., & Parvizi, M. (2017). Composition of minerals and trace elements at Mamasani thermal source: A possible preventive treatment for some skin diseases. *Journal of Education and Health Promotion*, 6(1), 110.
- Heleno, S. A., Ferreira, I. C. F. R., Esteves, A. P., & Ana, C. (2010). *extract, p - hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. Food Chemistry*, 1–25.
- Herrero, M., Sánchez-camargo, A. P., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2015). Trends in Analytical Chemistry Plants, seaweeds , microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 26–38.
- ISO. International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feedings stuffs – Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions. ISO 15213. 2003. 1-6.
- ISO. International Organization for Standardization. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 2: Colony count at 30 °C by the surface plating technique. ISO 4833-2. 2013. 1-12.
- ISO. International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique. ISO 4832. 2006. 1-6.
- ISO. International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95. ISO 21527-1. 2008. 1-8.

- ISO. International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95. ISO 21527-2. 2008. 1-9.
- Kirkland, A. E., Sarlo, G. L., & Holton, K. F. (2018). The role of magnesium in neurological disorders. In *Nutrients* (Vol. 10, Issue 6). MDPI AG.
- Lee, J. H., Alford, L., Kannan, G., & Kouakou, B. (2017). Curing properties of sodium nitrite in restructured goat meat (chevon) jerky. *International Journal of Food Properties*, 20(3), 526–537.
- Liang, J., Kang, D., Wang, Y., Yu, Y., Fan, J., & Takashi, E. (2015). Carbonate ion-enriched hot spring water promotes skin wound healing in nude rats. *PLoS ONE*, 10(2).
- Mark, R., Lyu, X., Lee, J. J. L., Parra-Saldívar, R., & Chen, W. N. (2019). Sustainable production of natural phenolics for functional food applications. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 57, pp. 233–254). Elsevier Ltd.
- Marques, J. M., Eggenkamp, H. G. M., Carreira, P. M., & Antunes da Silva, M. (2020). Origin and evolution of Cl in CO<sub>2</sub>-rich thermal and mineral waters from northern Portugal. *Applied Geochemistry*, 116.
- Mérida-Ortega, Á., Hernández-Alcaraz, C., Hernández-Ramírez, R. U., García-Martínez, A., Trejo-Valdivia, B., Salinas-Rodríguez, A., Svensson, K., Cebrián, M. E., Franco-Marina, F., & López-Carrillo, L. (2016). Phthalate exposure, flavonoid consumption and breast cancer risk among Mexican women. *Environment International*, 96, 167–172.
- Min, B. R., Solaiman, S., Waldrip, H. M., Parker, D., Todd, R. W., & Brauer, D. (2020). Dietary mitigation of enteric methane emissions from ruminants: A review of plant tannin mitigation options. *Animal Nutrition*, 6(3), 231–246.
- Mira-Sánchez, M. D., Castillo-Sánchez, J., & Morillas-Ruiz, J. M. (2020). Comparative study of rosemary extracts and several synthetic and natural food antioxidants. Relevance of carnosic acid/carnosol ratio. *Food Chemistry*, 309(May 2019), 125688.
- Moczkowska, M., Karp, S., Horbanczuk, O. K., Hanula, M., Wyrwisz, J., & Kurek, M. A. (2020). Effect of Rosemary Extract Addition on Oxidative Stability and Quality of Hemp Seed Oil. *Food and Bioproducts Processing*, 124, 33–47.

- Mokdad, R., Seguin, C., Fournel, S., Frisch, B., Heurtault, B., & Hadjsadok, A. (2022). Anti-inflammatory effects of free and liposome-encapsulated Algerian thermal waters in RAW 264.7 macrophages. *International Journal of Pharmaceutics*, 614.
- Ng, K. R., Lyu, X., Mark, R., & Chen, W. N. (2019). Antimicrobial and antioxidant activities of phenolic metabolites from flavonoid-producing yeast: Potential as natural food preservatives. *Food Chemistry*, 270, 123–129.
- Nguefack, J., Dongmo, J. B. L., Dakole, C. D., Leth, V., Vismer, H. F., Torp, J., Guemdjom, E. F. N., Mbeffo, M., Tamgue, O., Fotio, D., Zollo, P. H. A., & Nkengfack, A. E. (2009). Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2–3), 151–156.
- Nieto, G., Díaz, P., Bañón, S., & Garrido, M. D. (2010). Dietary administration of ewe diets with a distillate from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis* L.): Influence on lamb meat quality. *Meat Science*, 84(1), 23–29.
- Nieto, G., Ros, G., & Castillo, J. (2018). Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review. *Medicines*, 5(3), 98.
- Nunes, F., Rodrigues, M., Ribeiro, M. P., Ugazio, E., Cavalli, R., Abollino, O., Coutinho, P., & Araujo, A. R. T. S. (2019). Incorporation of Cró thermal water in a dermocosmetic formulation: cytotoxicity effects, characterization and stability studies and efficacy evaluation. *International Journal of Cosmetic Science*, 41(6), 604–612.
- Pedrosa, M. C., Ueda, J. M., Melgar, B., Dias, M. I., Pinela, J., Calhelha, R. C., Ivanov, M., Soković, M., Heleno, S., da Silva, A. B., Carocho, M., Ferreira, I. C. F. R., & Barros, L. (2021). Preservation of chocolate muffins with Lemon Balm, Oregano, and Rosemary extracts. *Foods*, 10(1), 1–18.
- Pereira, D., Pinheiro, R. S., Heldt, L. F. S., de Moura, C., Bianchin, M., Almeida, J. de F., dos Reis, A. S., Ribeiro, I. S., Haminiuk, C. W. I., & Carpes, S. T. (2017). Rosemary as natural antioxidant to prevent oxidation in chicken burgers. *Food Science and Technology (Brazil)*, 37, 17–23.
- Pereira, E., Pimenta, A. I., Calhelha, R. C., Antonio, A. L., Verde, S. C., Barros, L., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Effects of gamma irradiation on cytotoxicity and phenolic compounds of *Thymus vulgaris* L. and *Mentha x piperita* L. *LWT*, 71, 370–377.

- Petiwala, S. M., & Johnson, J. J. (2015). Diterpenes from rosemary ( *Rosmarinus officinalis* ): Defining their potential for anti-cancer activity. *Cancer Letters*, *367*(2), 93–102.
- Pires, E. O., Caleja, C., Garcia, C. C., Ferreira, I. C. F. R., & Barros, L. (2021). Current status of genus *Impatiens*: Bioactive compounds and natural pigments with health benefits. *Trends in Food Science and Technology*, August 2020.
- Quintaes, K. D., & Diez-Garcia, R. W. (2015). The importance of minerals in the human diet. In *Handbook of Mineral Elements in Food* (pp. 1–21). John Wiley & Sons, Ltd.
- Quintana, S. E., Villanueva-Bermejo, D., Reglero, G., García-Risco, M. R., & Fornari, T. (2019). Supercritical antisolvent particle precipitation and fractionation of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts. *Journal of CO2 Utilization*, *34*, 479–489.
- Reihani, S. F. S., Tan, T. C., Huda, N., & Easa, A. M. (2014). Frozen storage stability of beef patties incorporated with extracts from ulam raja leaves (*Cosmos caudatus*). *Food Chemistry*, *155*, 17–23.
- Ribeiro, A., Caleja, C., Barros, L., Santos-Buelga, C., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Rosemary extracts in functional foods: Extraction, chemical characterization and incorporation of free and microencapsulated forms in cottage cheese. *Food and Function*, *7*(5), 2185–2196.
- Ribeiro-Santos, R., Carvalho-Costa, D., Cavaleiro, C., Costa, H. S., Albuquerque, T. G., Castilho, M. C., Ramos, F., Melo, N. R., & Sanches-Silva, A. (2015). A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends in Food Science and Technology*, *45*(2), 355–368.
- Ribet, V., Mielewczyk, E., Sirvent, A., Georgescu, V., & Rossi, A. B. (2018). A novel dermo-cosmetic product containing thermal spring water, sucralfate, copper sulfate, and zinc sulfate in the management of hand eczema. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, *11*, 373–381.
- RTS Araujo, A. (2017). Thermal Cosmetics as Therapeutic Adjuvant for Dermatological Disorders. *Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, *3*(5).
- Sacco, C., Bellumori, M., Santomauro, F., Donato, R., Capei, R., Innocenti, M., & Mulinacci, N. (2015). An in vitro evaluation of the antibacterial activity of the non-volatile phenolic fraction from rosemary leaves. *Natural Product Research*, *29*(16), 1537–1544.

- Sammani, M. S., Clavijo, S., & Cerdà, V. (2021). Recent, advanced sample pretreatments and analytical methods for flavonoids determination in different samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 138.
- Sampaio, S. L., Lonchamp, J., In, M., Liddle, C., Petropoulos, S. A., Glamo, J., Santos-buelga, C., Ferreira, I. C. F. R., & Barros, L. (2021). *Anthocyanin-rich extracts from purple and red potatoes as natural colourants : Bioactive properties , application in a soft drink formulation and sensory analysis*. 342(November 2020).
- Sánchez-Camargo, A. del P., & Herrero, M. (2017). Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) as a functional ingredient: recent scientific evidence. *Current Opinion in Food Science*, 14, 13–19.
- Senanayake, S. P. J. N. (2018). *Rosemary extract as a natural source of bioactive compounds*. 51–57.
- Silva, A., Oliveira, A. S., Vaz, C. v., Correia, S., Ferreira, R., Breitenfeld, L., Martinez-de-Oliveira, J., Palmeira-de-Oliveira, R., Pereira, C. M. F., Palmeira-de-Oliveira, A., & Cruz, M. T. (2020). Anti-inflammatory potential of Portuguese thermal waters. *Scientific Reports*, 10(1).
- Silva, V., Falco, V., Dias, M. I., Barros, L., Silva, A., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Amaral, J. S., Igrejas, G., Ferreira, I. C. F. R., & Poeta, P. (2020). Evaluation of the phenolic profile of *Castanea sativa* mill. By-products and their antioxidant and antimicrobial activity against multiresistant bacteria. *Antioxidants*, 9(1).
- Souilem, F., Fernandes, Â., Calhêla, R. C., Barreira, J. C. M., Barros, L., Skhiri, F., Martins, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Wild mushrooms and their mycelia as sources of bioactive compounds: Antioxidant , anti-inflammatory and cytotoxic properties. *Food Chemistry*, 230, 40–48.
- Stabnikova, O., Marinin, A., & Stabnikov, V. (2021). *Main trends in application of novel natural additives for food production*. 10(3), 524–551.
- Takwa, S., Caleja, C., Barreira, J. C. M., Soković, M., Achour, L., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). *Arbutus unedo* L. and *Ocimum basilicum* L. as sources of natural preservatives for food industry: A case study using loaf bread. *LWT - Food Science and Technology*, 88, 47–55.
- Tardy, A. L., Pouteau, E., Marquez, D., Yilmaz, C., & Scholey, A. (2020). Vitamins and minerals for energy, fatigue and cognition: A narrative review of the biochemical and clinical evidence. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 1). MDPI AG.

- Torres, M. D., Fradinho, P., Raymundo, A., Sousa, I., Falqué, E., & Domínguez, H. (2021). The key role of thermal waters in the development of innovative gelled starch-based matrices. *Food Hydrocolloids*, 117.
- Ueda, J. M., Pedrosa, M. C., Fernandes, F. A., Rodrigues, P., Melgar, B., Dias, M. I., Pinela, J., Calhela, R. C., Ivanov, M., Soković, M., Heleno, S. A., Carcho, M., Ineu, R. P., Ferreira, I. C. F. R., & Barros, L. (2021). Promising preserving agents from sage and basil: A case study with yogurts. *Foods*, 10(3), 676.
- Valeriani, F., Margarucci, L. M., & Spica, V. R. (2018). Recreational use of spa thermal waters: Criticisms and perspectives for innovative treatments. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 15, Issue 12).
- Wolfe, K. L., & Rui, H. L. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 8896–8907.
- Zajac, D. (2021). Inhalations with thermal waters in respiratory diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 281(July), 114505.