



**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

***Rubus ulmifolius* Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos**

Liliana Primo da Silva

Tese apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança
e à Universidade de Salamanca para obtenção do
Grau de Mestre em Farmácia e Química de Produtos Naturais

Orientado por:

**Professora Doutora Isabel C. F. R. Ferreira
Doutora Lillian Barros**

Bragança

2018

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



AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer de forma grandiosa aos meus pais, pela educação e transmissão de valores, paciência, carinho, apoio e, principalmente, por acreditarem sempre em mim e nunca me deixarem desistir dos meus sonhos, dedicação esta que permitiu chegar até esta etapa. À minha querida irmã, que apesar da distância, transmitiu apoio constante, palavras sábias e força para seguir sempre em frente sem medo. Com muita gratidão, a eles dedico este trabalho, porque juntos podemos ultrapassar tudo.

Aos meus amigos, família do coração, pelo companheirismo, motivação constante e apoio nos momentos de ansiedade.

Às professoras e orientadoras Doutora Isabel C.F.R. Ferreira e Doutora Lillian Barros, pela oportunidade de realizar este trabalho e especialmente por toda a experiência e ensinamentos transmitidos.

À Doutora Eliana Pereira pelo acompanhamento, ensinamento e disponibilidade no decorrer deste trabalho.

Ao Doutor Miguel Angel e à professora Doutora Olívia Pereira pelo empenho e disponibilidade na colaboração deste trabalho. Em especial ao Doutor Miguel por todas as palavras de encorajamento e incentivo para o sucesso desta etapa.

A toda equipa do BioChemCore, que permitiram a realização deste trabalho, transmitindo ensinamentos em diversas áreas, auxílio constante e boa disposição.

Aos colegas que conheci no decorrer deste mestrado, pelo companheirismo e partilha de momentos.

A todos os que, de uma forma direta ou indireta, contribuíram para o sucesso de mais uma conquista.

Um enorme obrigada!

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE EQUAÇÕES	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1. Aditivos alimentares	24
1.1.1. A subclasse dos corantes.....	28
1.2. A revitalização da “era natural”.....	33
1.2.1. Vantagens da utilização de matrizes naturais	35
1.2.2. As antocianinas como corantes naturais	37
1.3. <i>Rubus ulmifolius</i> Schott como uma fonte promissora	42
1.3.1. Compostos fenólicos não antociânicos	44
1.3.2. Antocianinas	47
1.3.3. Outros constituintes químicos.....	48
1.3.4. Propriedades bioativas	51
2. OBJETIVOS	57
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	61
3.1. Preparação da amostra	61
3.2. Padrões e reagentes.....	61
3.2.1. Análise química	61
3.2.2. Estudo de bioatividades	62
3.3. Determinação do valor nutricional dos frutos de <i>Rubus ulmifolius</i>	62
3.4. Avaliação da cor nos frutos de <i>Rubus ulmifolius</i>	63
3.5. Determinação da composição química dos frutos de <i>Rubus ulmifolius</i>	64
3.5.1. Açúcares.....	64
3.5.2. Ácidos orgânicos.....	65
3.5.3. Ácidos gordos	65
3.5.4. Tocoferóis	66
3.5.5. Compostos fenólicos.....	67

3.6.	Avaliação das propriedades bioativas dos frutos de <i>Rubus ulmifolius</i>	70
3.6.1.	Análise da atividade antimicrobiana	70
3.6.2.	Avaliação da citotoxicidade em linhas celulares tumorais	72
3.6.3.	Avaliação da hepatotoxicidade em células não tumorais.....	73
3.7.	Otimização do processo de extração para obtenção de um corante natural à base de antocianinas, a partir dos frutos de <i>Rubus ulmifolius</i>	74
3.7.1.	Extração assistida por calor (HAE).....	75
3.7.2.	Preparação dos extratos obtidos pelo HAE.....	75
3.7.3.	Quantificação dos compostos antociânicos por HPLC-DAD.....	76
3.7.4.	Formato de resposta utilizada para processos analíticos.....	76
3.7.5.	Desenho experimental, modelo de análise e avaliação estatística	77
3.8.	Preparação do extrato rico em antocianinas a partir do fruto de <i>Rubus ulmifolius</i>	79
3.8.1.	Avaliação do potencial corante do extrato rico em antocianinas do fruto de <i>Rubus ulmifolius</i>	80
3.8.2.	Avaliação das propriedades bioativas do extrato rico em antocianinas do fruto de <i>Rubus ulmifolius</i>	80
3.9.	Incorporação do extrato rico em antocianinas do fruto de <i>Rubus ulmifolius</i> num produto de pastelaria – “donuts”	80
3.9.1.	Preparação do produto de pastelaria – “donuts”	80
3.9.2.	Avaliação dos parâmetros de cor das amostras de “donuts” durante o tempo de armazenamento	82
3.9.3.	Avaliação da composição nutricional e química das amostras de “donuts” ..	82
3.10.	Análise estatística	83
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
4.1.	Determinação do valor nutricional e dos parâmetros de cor dos frutos de <i>Rubus ulmifolius</i>	85
4.2.	Determinação da composição química dos frutos de <i>Rubus ulmifolius</i>	86
4.3.	Determinação da composição fenólica dos frutos de <i>Rubus ulmifolius</i>	91
4.4.	Avaliação do potencial bioativo de frutos de <i>Rubus ulmifolius</i>	96
4.4.1.	Atividade antimicrobiana.....	96
4.4.2.	Atividade citotóxica	99

4.5.	Otimização do processo de extração de um corante natural à base de antocianinas obtido a partir dos frutos de <i>Rubus ulmifolius</i> aplicando uma MSR.....	99
4.5.1.	Análise MSR, verificação estatística e efeito das variáveis de extração na resposta.....	102
4.5.2.	Condições numéricas ótimas que maximizam a extração e verificação experimental dos modelos preditivos.....	108
4.5.3.	Análise dose-resposta do efeito da relação sólido-líquido nas condições ótimas.....	108
4.6.	Potencial corante do extrato rico em antocianinas obtido a partir dos frutos de <i>Rubus ulmifolius</i>	110
4.7.	Avaliação das propriedades bioativas do extrato rico em antocianinas obtido após otimização do processo de extração	111
4.7.1.	Atividade citotóxica e antimicrobiana	111
4.8.	Estudo de incorporação num produto de pastelaria do extrato rico em antocianinas obtido dos frutos de <i>Rubus ulmifolius</i>	112
4.8.1.	Avaliação dos parâmetros de cor, caracterização nutricional e química dos “donuts”... ..	112
5.	CONCLUSÃO.....	119
6.	BIBLIOGRAFIA.....	122

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>a</i>*	Cromaticidade verde-vermelho
A	Composto antociânico
A1	Canidina- <i>O</i> -di-hexósido
A2	Cianidina-3- <i>O</i> -glucósido
A3	Pelargonidina-3- <i>O</i> -glucósido
A4	Cianidina-3- <i>O</i> -xilósido
A5	Cianidina-3- <i>O</i> -dioxail-glucósido
AA	Ácido ascórbico
AFT	Ácidos fenólicos totais
AOAC	Associação de comunidades analíticas
AP-1	Fator de transcrição regulador de expressão génica
AT	Conteúdo total de antocianinas
<i>b</i>₀	Coefficiente constante
<i>b</i>_{<i>i</i>}	Coefficiente de efeito linear
<i>b</i>_{<i>ii</i>}	Coefficiente de efeito quadrático
<i>b</i>_{<i>ij</i>}	Coefficiente de efeito de interação
<i>b</i>_{<i>ijj</i>}	Coefficiente de efeito de interação quadrática
BHT	Hidroxitolueno butilado
CAT	Compostos antociânicos totais
CE	Energia de colisão
CES	Espalhamento da energia de colisão
CFTNA	Compostos fenólicos totais não antociânicos
CIE	Commission International de l'Eclairag
CMB	Concentração mínima bactericida
CMI	Concentrações mínimas inibitórias
CMF	Concentração mínima fungicida
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DAD	Detetor de díodos
DCCC	Desenho composto central circunscrito
DDA	Dose diária admissível

DHA	Ácido docosa-hexaenóico
DHAA	Ácido desidroascórbico
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Potencial de não-cluster
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
E	Europa
EC₅₀	Concentração de extrato com 50% de efeito
ECACC	Coleção Europeia de culturas de células autenticadas
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFSA	Autoridade de segurança alimentar europeia
EP	Potencial de entrada
EPA	Ácido eicosapentaenóico
EPI	Ião produto
Eq.	Equação
ERK	Proteína cinase regulada por sinais extracelulares
ESI	Fonte de ionização por espalhamento de eletrões
ET	Elagitanino
FAME	Éster metílico de ácido gordo
FAO	Organização das Nações Unidas para a alimentação e a agricultura
FDA	Administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos
FID	Detetor de ionização de chama
FP	Detetor de fluorescência
FTNA	Flavonoides totais não antociânicos
<i>g</i>	Força <i>g</i> (unidade de rotação)
GC	Cromatografia Gasosa
GI₅₀	Concentração que inibe 50% de crescimento celular
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
GTP	Trifosfato de guanosina
GTPase	Enzimas hidrolases de GTP
HAE	Extração assistida por calor
HBSS	Solução Balanceada de Hank 's
HCl	Ácido clorídrico

HClO₄	Ácido perclórico
HeLa	Linha celular humana de carcinoma cervical
HepG2	Linha celular humana de carcinoma hepatocelular
HHDP	Ácido hexa-hidroxidifénico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
H₂O₂	Peroxido de hidrogénio
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
INS	Sistema de numeração internacional
INT	Cloreto de <i>p</i> -iodonitrotetrazólio
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
JECFA	Comité conjunto FAO/OMS de peritos em aditivos alimentares e contaminantes
kcal	Quilocaloria
L*	Luminosidade
LC	Cromatografia líquida
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LOO•	Radical peróxido lipídico
LOOH	Hidroperóxido lipídico
LPS	Lipopolissacárido
<i>m</i>	Valor paramétrico do declive
<i>m/z</i>	Razão massa carga
MA	Malte agar
MAPK	Proteínas - cinases ativadas por mitógenos
MCF-7	Linha celular humana de adenocarcinoma mamário
Mek	Cinase MAPK
mf	Massa fresca
MKK	MAP cinase cinase
MHB	Caldo Müller-Hinton
min	Minuto
MSR	Metodologia de superfície de resposta
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MS	Espectroscopia de massa
ms	Massa seca

MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados
<i>n</i>	Número de variáveis
NADH	Hidreto de nicotinamida adenina dinucleótido
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NCI-H460	Linha celular de carcinoma do pulmão
OMS	Organização mundial de saúde
ORAC	Capacidade de absorção do radical oxigênio
pH	Potencial de hidrogénio iónico
PI	Padrão interno
PLP2	Cultura de células primárias de fígado de porco
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
R	Resíduo do extrato
<i>R</i>²	Coefficiente de determinação
ROO·	Radical peróxido
ROS	Espécies reativas de oxigénio
<i>rpm</i>	Rotações por minuto
RPMI	Meio Instituto Memorial Parque Roswell
S	Solvente
SD	Desvio padrão
SFA	Ácidos gordos saturados
SFB	Soro fetal bovino
SRB	Sulforodamina B
S/L	Razão sólido líquido
t	Tempo
T	Temperatura
TCA	Ácido tricloroacético
TFA	Ácido trifluoroacético
Tr	Tempo de retenção
U	Unidade de massa atómica
UFC	Unidade de formação de colónias
UFLC	Cromatografia líquida ultra rápida
UV	Ultravioleta

***Rubus ulmifolius* Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos**

UV-Vis	Ultravioleta - Visível
v	Volume
W	Potência
X_1	Variável tempo
X_2	Variável temperatura
X_3	Variável percentagem de etanol no solvente
X_4	Variável razão sólido-líquido
$X_i ; X_j$	Variáveis independentes
Y	Formato de resposta
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação
ω	Omega

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classes de corantes e respetivas estruturas químicas.	30
Tabela 2. Usos tradicionais de diferentes partes da planta <i>Rubus ulmifolius</i> Schott.	44
Tabela 3. Compostos fenólicos não antociânicos identificados em frutos de <i>Rubus ulmifolius</i>	46
Tabela 4. Antocianinas isoladas dos frutos da <i>Rubus ulmifolius</i>	48
Tabela 5. Delineamento experimental e codificação das variáveis independentes usadas no desenho fatorial <i>DCCC</i> com 5 níveis.	77
Tabela 6. Parâmetros nutricionais e parâmetro físico (cor - CIE $L^*a^*b^*$) dos frutos de <i>Rubus ulmifolius</i>	86
Tabela 7. Composição química dos frutos de <i>Rubus ulmifolius</i>	91
Tabela 8. Tempo de retenção (Tr), comprimento de onda de máxima absorção na região do visível (λ_{max}), dados dos espectros de massa, tentativa de identificação e quantificação dos compostos não antociânicos e antociânicos dos frutos de <i>Rubus ulmifolius</i>	95
Tabela 9. Resultados da avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico dos frutos de <i>Rubus ulmifolius</i>	98
Tabela 10. Resultados experimentais de MSR do <i>DCCC</i> para a otimização das três variáveis principais envolvidas (X_1 , X_2 e X_3) na HAE.	104
Tabela 11. Resultados paramétricos da equação polinomial de segunda ordem da Equação 3 para as respostas usadas na otimização de HAE. Informação estatística do procedimento de ajuste ao modelo apresentado e condições variáveis que levam a valores de resposta ótimos para as respostas consideradas.	105
Tabela 12. Quantidade de antocianinas no resíduo e parâmetros de cor do extrato rico em antocianinas obtido nas condições ótimas	111
Tabela 13. Resultados relativos ao potencial antimicrobiano e citotóxico do extrato ótimo rico em antocianinas obtido dos frutos de <i>Rubus ulmifolius</i>	112
Tabela 14. Parâmetros de cor medidos no “donuts” controlo e incorporados com o extrato rico em antocianinas, obtido a partir dos frutos de <i>Rubus ulmifolius</i>	113
Tabela 15. Composição nutricional dos “donuts” controlo e incorporados com o extrato ótimo rico em antocianinas obtido dos frutos de <i>Rubus ulmifolius</i>	114
Tabela 16. Composição em açúcares livres dos “donuts” controlo e incorporados com o extrato rico em antocianinas obtido dos frutos de <i>Rubus ulmifolius</i>	114

***Rubus ulmifolius* Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos**

Tabela 17. Composição em ácidos gordos dos “donuts” controlo e incorporados com o extrato rico em antocianinas obtido dos frutos de *Rubus ulmifolius*. 115

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do corante mauveína.....	29
Figura 2. Estrutura química do catião flavílico.	38
Figura 3. Tipos de antocianinas.....	38
Figura 4. Esquema representativo da interconversão estrutural das formas dominantes de antocianinas em fase aquosa, dependente de pH, e respetiva cor apresentada.....	40
Figura 5. Imagens ilustrativas das características de frutos, flores e folhas da <i>Rubus ulmifolius</i>	42
Figura 6. Estrutura base C6-C3-C6 dos flavonoides.....	46
Figura 7. Esquema representativo da atividade antioxidante sinérgica da vitamina E e C na peroxidação lipídica.....	50
Figura 8. Esquema representativo das bioatividades de compostos fenólicos.....	52
Figura 9. Cascata MAPK (proteína cinase ativada pelo mitogene).....	55
Figura 10. Representação esquemática dos objetivos do presente trabalho.....	58
Figura 11. Modelo das coordenadas tridimensionais da cor: CIE $L^* a^* b^*$	63
Figura 12 Processo de purificação dos compostos fenólicos não antociânicos.....	68
Figura 13. Exemplo representativo da leitura de resultados do teste de INT.....	72
Figura 14. Exemplo representativo dos resultados obtidos num ensaio SRB.....	74
Figura 15. Procedimento de extração de antocianinas	75
Figura 16. Cromatograma obtido para identificação dos compostos antociânicos	77
Figura 17. Ingredientes utilizados para elaboração dos “donut”	81
Figura 18. Amostras de donuts com extrato antociânico (cor roxa) e donut controlo ..	82
Figura 19. Medição das coordenadas CIE $L^* a^* b^*$ nos donuts	82
Figura 20. Cromatograma dos compostos fenólicos encontrados nos frutos de <i>Rubus ulmifolius</i>	96
Figura 21. Diagrama representativo das etapas realizadas no decorrer da otimização das condições que maximizam as respostas de extração (mg A/g E dw) de antocianinas e o resíduo total extraído (Rendimento, %).....	101
Figura 22. Ilustração dos resultados gráficos do HAE para o rendimento de extração do material obtido (%), o conteúdo total de antocianinas detetadas (AT, mg/g E) e a antocianina detetada como maioritária (A2, mg/g E).....	106

Figura 23. Ilustração dos resultados gráficos para a HAE para o conteúdo das três antocianinas detetadas em menor concentração (A2 a A5, em mg/g E). 107

Figura 24. Resumo final dos efeitos de todas as variáveis avaliadas para o método HAE.. 110

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 1. Equação para determinação de hidratos de carbono.....	63
Equação 2. Equação para determinação da energia total	63
Equação 3. Equação polinomial de segunda ordem usada no modelo matemático	78

RESUMO

A cor tem sido considerada a característica mais importante num alimento, dado que gera expectativas acerca da palatabilidade, sendo determinante para a aceitabilidade e consumo por parte do consumidor. No sentido de fornecer ao consumidor produtos mais saudáveis, a indústria alimentar tem demonstrado elevado interesse na substituição de aditivos artificiais por alternativas naturais, a fim de promover uma melhor qualidade dos produtos.

A espécie *Rubus ulmifolius* Schott é conhecida pelos seus frutos - a amora silvestre, os quais apresentam um grande teor em compostos bioativos, nomeadamente corantes naturais, como as antocianinas.

Neste trabalho foi estudado o perfil químico e nutricional dos frutos de *R. ulmifolius*, assim como o seu potencial bioativo, através de ensaios de citotoxicidade e atividade antimicrobiana. Foi efetuada também a otimização do processo de extração de antocianinas através de uma técnica assistida por calor (HAE), usando um método de análise de superfície de resposta. O extrato rico em compostos antociânicos, obtido no final do processo, foi avaliado em termos do seu potencial corante (medição da cor do extrato e quantificação dos compostos antociânicos) e da sua bioatividade (citotoxicidade e atividade antimicrobiana) e incorporado num produto de pastelaria – “donuts”.

O valor nutricional da amostra foi analisado utilizando metodologias oficiais de análise de produtos alimentares (AOAC), evidenciando-se um perfil nutricional rico em hidratos de carbono e baixo em gordura.

No estudo da composição química, os açúcares foram avaliados através de um sistema de HPLC-RI, os ácidos orgânicos por UFLC-DAD, os tocoferóis por HPLC-fluorescência e os ácidos gordos por GC-FID. Na análise relativa ao perfil de açúcares livres, foram detetadas as moléculas de frutose, glucose e sacarose, evidenciando-se a frutose como o composto presente em maior concentração. No que concerne aos ácidos orgânicos, foram identificados os ácidos oxálico, málico, chiquímico, ascórbico, fumárico e quínico, destacando-se este último, com o teor mais elevado. A análise ao perfil de ácidos gordos, identificou 25 compostos distintos, maioritariamente polinsaturados, destacando-se o ácido linoleico (C18:2n6) com a maior concentração. Além disso, os frutos apresentaram todas as isoformas de tocoferóis, α -, β -, γ - e δ -tocoferol, sendo o γ -tocoferol o vitámero maioritário.

Na determinação da composição fenólica, após a sua análise por HPLC-DAD-ESI/MS, os frutos de *R. ulmifolius* revelaram a presença de 11 compostos fenólicos não antociânicos, salientando-se o pentósido do ácido elágico e 5 compostos antociânicos, destacando-se a cianidina-3-*O*-glucósido. As antocianinas foram as moléculas encontradas em maior concentração no extrato dos frutos de *R. ulmifolius*.

O potencial bioativo, foi avaliado através de ensaios *in vitro*, através de 2 parâmetros: a atividade citotóxica, utilizando quatro linhas celulares tumorais humanas (HepG2, NCI-H460, MCF-7 e HeLa) e a uma cultura de células primárias não tumorais (PLP2; células de fígado de porco), aplicando o ensaio da sulforrodamina B; e a atividade antimicrobiana, aplicando o método de microdiluição em bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, e numa estirpe de fungo. Os resultados demonstraram que a nível citotóxico as amostras não revelaram qualquer capacidade anti-proliferativa em nenhuma das linhas celulares testadas, mas também não manifestaram toxicidade nas células não-tumorais. Quanto à atividade antimicrobiana obtiveram-se resultados promissores, tendo os extratos exibido um efeito bacteriostático e fungistático, com valores de CMI (concentração mínima inibitória) entre 5 e 20 mg/mL.

Relativamente ao procedimento da otimização da extração para a obtenção de um extrato rico em antocianinas, o método utilizado determinou como condições ótimas de extração $t = 20,0 \pm 0,60$ min, $T = 56,87 \pm 3,41$ °C e % de etanol = $46,07 \pm 3,69$. O processo de extração utilizado (HAE) conduziu a rendimentos satisfatórios com valores de $68,60 \pm 3,54$ %, obtendo-se para o mesmo um teor total de antocianinas de 33,58 mg AT/g E. A razão sólido-líquido determinada ($S/L = 25$ g/L), permitiu um processo mais rentável e sustentável.

O extrato ótimo evidenciou potencial corante, obtendo-se níveis de antocianinas próximos dos previstos pelo modelo e o extrato apresentou uma coloração vermelho-bordô. A nível antimicrobiano, os valores de CMI oscilaram entre 2,5 e 20 mg/mL, sendo as estirpes MRSA e *Morganella morganii* as que sofreram mais efeitos bacteriostáticos (CMI= 2,5 mg/mL). Por outro lado, a nível do potencial citotóxico, o extrato manifestou capacidade anti-proliferativa em todas as linhas celulares tumorais testadas e ausência de toxicidade nas células não-tumorais.

Quando se procedeu à incorporação do extrato rico em compostos corantes nos “donuts” foram obtidos resultados bastante promissores, nomeadamente na fixação da cor rosa/lilás

***Rubus ulmifolius* Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos**

na massa do produto alimentar e após cozedura, e preservação da mesma ao longo de 3 dias de armazenamento, sem alteração da composição nutricional.

Os frutos da espécie *R. ulmifolius* provaram ser uma rica fonte de compostos antociânicos, sendo uma matriz natural promissora para futuras aplicações na indústria alimentar, com o intuito de substituir corantes artificiais.

ABSTRACT

Colour has been considered the most impressive attribute of foodstuffs, because it generates expectancies about palatability, determining consumers acceptability of the product. In order to provide healthier products, the food industry has been searching for natural alternatives to replace artificial additives, providing high quality foodstuffs.

The species *Rubus ulmifolius* Schott, frequently known for its fruits - elmleaf blackberry, has been described to present a rich composition in bioactive compounds, namely natural colorants, such as anthocyanins.

In the present study the chemical and nutritional profile of *R. ulmifolius* fruits were studied, as well as, its bioactive potential through antimicrobial and cytotoxic properties evaluation. An optimization of the extraction of anthocyanins, through a heat assisted extraction method (HAE), was also performed by using the response surface analysis methodology. The anthocyanin rich extract obtained was evaluated concerning its colorant potential (color evaluation and quantification of anthocyanic compounds) and also its bioactivity (antimicrobial and cytotoxic activities), and then it was further incorporated into a bakery product - “donuts”.

The nutritional value of the sample was analysed according to official methodologies of food analysis (AOAC), showing a high carbohydrate content with low-fat values. The chemical characterization was achieved through the analysis of free sugars by HPLC-RI, organic acids by UFLC-DAD, tocopherols by HPLC-FL, and fatty acids by GC-FID. Regarding sugars' analysis, fructose, glucose and sucrose were the identified free sugars, highlighting fructose as the main molecule. Concerning organic acids, oxalic, malic, shikimic, ascorbic, fumaric, and quinic acids were identified, being quinic acid the most abundant. The fatty acids profile revealed the presence of 25 compounds, being mostly represented by polyunsaturated fatty acids, being linoleic acid (C18:2n6) the main molecule present. All tocopherol isoforms were detected (α -, β -, γ - e δ -tocopherol) in the fruits, with γ -tocopherol as the most abundant vitamer.

The phenolic profile characterization was performed through an HPLC-DAD-ESI/MS analysis, and *R. ulmifolius* fruits revealed the presence of 11 non-anthocyanin compounds, being ellagic acid pentoside the major compound, while 5 anthocyanin compounds were identified, being cyanidin-3-*O*-glucoside the main molecule, and with these compounds present in the highest concentration in *R. ulmifolius* fruits.

The bioactive potential was evaluated using *in vitro* assays through the analysis of two parameters: antimicrobial activity determined by the microdilution method using clinical isolated from Gram-positive and Gram-negative bacteria and a fungi strain; cytotoxicity in four human tumor cell lines (HepG2, NCI-H460, MCF-7 e HeLa) and in a primary non-tumor cell culture (PLP2; porcine liver cells), using sulforhodamine B assay. The antimicrobial activity revealed promising results, with good bacteriostatic and fungistatic effects (MIC values ranging between 5 and 20 mg/mL). Concerning cytotoxic evaluation, the extract did not show any anti-proliferative activity in the tumor cell lines tested, but it also did not exhibit toxicity in the non-tumor cell culture.

In relation to the extraction process optimization, in order to obtain an anthocyanin rich extract the optimum conditions applied were: $t = 20.0 \pm 0.60$ min, $T = 56.87 \pm 3.41$ °C and % ethanol = 46.07 ± 3.69 . The HAE extraction process showed a relevant yield value of $68.60 \pm 3.54\%$, being quantified a total anthocyanins' content of 33.58 mg AT/g E. The solid-liquid ratio obtained ($S/L = 25$ g/L) allowed a more profitable and sustainable process.

The optimized extract revealed a potent coloring capacity associated to its anthocyanin content, which was similar to those predicted by the RSM model system, revealing a red-burgundy color. The antimicrobial analysis of the optimized extract revealed higher MIC values, being MRSA and *Morganella morganii* the most susceptible strains (MIC= 2.5 mg/mL). On the other hand, the optimized extract exhibited an anti-proliferative activity in all the tumor cell lines tested, and absence of toxicity for non-tumor cells.

When the extract rich in colorant compounds was incorporated in “donuts”, very promising results were obtained, namely regarding the coloring capacity of the extract, being able to give a pink/lilac color to the donuts after baking, and being able to stabilize the colour over 3 days of storage, without significant variation of the donuts nutritional value.

R. ulmifolius fruits proved to be a rich source of anthocyanic compounds, being a promising natural matrices for future applications in the food industry to replace artificial food colorants.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aditivos alimentares

Desde a antiguidade que se verifica a necessidade de preservar e alterar características nos alimentos, principalmente características organoléticas. No entanto, devido à insipiência dos meios e técnicas industriais, era recorrente, sobretudo, o recurso às fontes naturais (Özcan, 2004). Deste modo, como meios de conservação eram utilizados o sal (para a carne e peixe) e o açúcar (para a fruta). Já para melhorar o sabor dos alimentos, recorria-se a especiarias e ervas encontradas no meio ambiente. Outros processos, habitualmente aplicados aos alimentos, eram a secagem e a defumação, tanto para conservação como para melhoria do seu sabor (“Overview of Food Ingredients, Additives & Colors,” n.d.; Pereira et al., 2015).

Com o crescimento populacional houve a necessidade de fomentar o comércio de produtos alimentares e, como tal, incrementar o desenvolvimento de técnicas agrícolas, industriais e tecnológicas, que permitissem uma maior produção de alimentos de forma segura, eficiente e rápida, a fim de suprimir todas as necessidades nutricionais (Winger & Wall, 2006; Carochó et al., 2014; Moragues-Faus et al., 2017; Sadowski & Baer-Nawrocka, 2018). Este aumento de produção deveria incidir no desenvolvimento de alimentos com características organoléticas favoráveis e com tempo de vida útil mais prolongado (Winger & Wall, 2006).

Os aditivos alimentares surgiram, desta forma, com o objetivo de conservar ou modificar características organoléticas nos produtos alimentares (Delgado-Vargas et al., 2000; Prado & Godoy, 2003; Carochó, et al., 2014; Asioli et al., 2017). A sua utilização tornou-se, desde então muito útil, permitindo tanto uma boa perceção e aceitação por parte dos consumidores, como também uma maior estabilidade química e física do próprio alimento. Contudo, devido ao avanço tecnológico e ao desenvolvimento no processamento alimentar, assistiu-se a uma diversificação do uso de aditivos mas também, algumas vezes, a uma adulteração de alimentos e, conseqüentemente, ao comprometimento da sua qualidade alimentar (Branen et al., 2005; Carochó et al., 2014).

Com o aparecimento de métodos para análise alimentar e, tendo em conta os regulamentos impostos para a segurança alimentar por parte da FDA (Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estado Unidos) e EFSA (Autoridade de Segurança Alimentar Europeia), o uso de aditivos alimentares tornou-se mais restritivo (Carochó et al., 2014).

Segundo o *Codex alimentarius*, um aditivo alimentar é definido como “qualquer substância não consumida habitualmente como género alimentício por si mesma e não utilizada como ingrediente típico nos géneros alimentícios, tendo ou não um valor nutritivo, mas sim cuja adição tem como finalidade atingir um determinado objetivo tecnológico (incluindo organolético) no processo de fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, transporte ou armazenagem, ou no decorrer de tais processos, ou que seja razoavelmente esperado que resulte (direta ou indiretamente) nestes ou nos seus subprodutos, tornando-se num componente ou afetando as características desses alimentos. O termo não inclui “contaminantes” ou substâncias adicionadas aos alimentos para manter ou melhorar as qualidades nutricionais.” (“Codex Alimentarius Commission - Procedural Manual,” n.d.).

Na união Europeia, todas essas substâncias são classificadas de acordo com o sistema de numeração internacional (INS) para os aditivos alimentares, definido pela Comissão do *Codex Alimentarius* (Upadhyay & Pandey, 2012). O objetivo consiste em generalizar a classificação, passando esta a ser comum em todos os países da União Europeia e, conseqüentemente, facilitar a sua implementação, monitorização da regulação e garantir também uma informação mais acessível aos consumidores, já que substitui uma denominação relativamente complexa da estrutura química dos compostos (Upadhyay & Pandey, 2012; Carochó et al., 2014).

A nomenclatura adotada inclui a letra “E” como prefixo, que representa Europa, e um número de 3 algarismos que identifica especificamente o aditivo alimentar. As principais classes de aditivos alimentares encontram-se associadas a um número, indicado em primeiro lugar, posteriormente ao prefixo E, de forma que: E1 representa os corantes, E2 os conservantes, E3 os antioxidantes, E4 os agentes de textura, E6 os intensificadores de sabor e E9 os adoçantes, sendo que as outras classes existentes não se inserem em nenhum número específico. Como exemplo tem-se o E102 que representa a tartrazina, corante alimentar, ou o E962 que representa o aspartame, pertencente à classe dos adoçantes (Carochó et al., 2014; Martins et al., 2016). Relativamente a países não pertencentes à União europeia, a classificação utilizada implica a mesma numeração, porém, sem a denominação “E” em prefixo, independentemente de ser permitido ou não na União Europeia (Upadhyay & Pandey, 2012).

Os aditivos alimentares podem classificar-se de acordo com a sua origem em: aditivos naturais, que se obtêm diretamente de plantas ou animais; semelhantes a aditivos naturais,

quando são produzidos por via sintética com o objetivo de mimetizar o natural; extraídos de matrizes naturais e alterados por processos químicos e, por fim, aditivos artificiais quando são exclusivamente produzidos por via sintética (Carocho et al., 2014).

Relativamente à classe podem ser divididos em seis grupos principais distintos dos quais: conservantes, aditivos com valor nutricional, corantes, agentes de melhoria de sabor, texturizantes e outros (Branen et al., 2005; Saltmarch, 2013; Carocho et al., 2014).

Na classe dos conservantes podem destacar-se os antimicrobianos (E200-E290), os antioxidantes (E300-E326) e os agentes para prevenção de escurecimento. Estes são geralmente usados com dois propósitos: para inibir a deterioração e consequentemente aumentar o tempo de vida do alimento e/ou para controlar a contaminação por microrganismos incluindo os patogénicos (Branen et al., 2005; Saltmarch, 2013; Carocho et al., 2014).

Os aditivos com valor nutricional visam fornecer ou enriquecer o valor nutricional dos produtos alimentares. Embora esta classe de aditivos não se encontre descrita pelo sistema de numeração E, alguns estão incluídos noutras classes, dada a sua ampla variedade de aplicações, tais como, a vitamina C ou a vitamina E, que representam duas vitaminas muito recorrentes, não só para acrescentar valor nutricional aos alimentos, mas também devido ao elevado poder antioxidante (Carocho et al., 2014). Embora, geralmente, sejam isoladas de fontes naturais como plantas e fungos (e.g., vitaminas, aminoácidos ou fibras), podem também ser obtidos por via sintética (Branen et al., 2005).

Por outro lado, os corantes são usados para alterar ou conferir cor ao produto alimentar, permitindo uma melhoria das características organolépticas e, portanto, uma maior apetência por parte dos consumidores, encontrando-se numerados entre E100-E180 (Prado & Godoy, 2003; Martins et al., 2016; Lin et al., 2018).

Relativamente aos agentes de melhoria de sabor, como o próprio nome indica, têm como finalidade alterar o sabor de um produto alimentar, melhorando-o, adoçando ou alterando integralmente o sabor final. Estes encontram-se divididos em 3 subgrupos: adoçantes de origem natural ou sintética (com numeração entre E900-E999), e de melhoria de sabor, classificados entre E620 e E640 (Branen et al., 2005; Carocho et al., 2014).

Os agentes texturizantes atuam sobre a consistência do alimento ao qual são incorporados, modificando-a ou estabilizando-a. Diferenciam-se em 2 grupos distintos: emulsionantes e estabilizantes. Os emulsionantes têm principal função manter a integridade e a dispersão de uma emulsão no alimento e, por isso, são moléculas que apresentam na sua

constituição um grupo hidrófilo e um grupo hidrófobo (Msagati, 2012; Carochó et al., 2014). Neste mesmo grupo estão incluídas substâncias de origem natural, tais como a lecitina (E322) e glicéridos, assim como, substâncias sintéticas (Branen et al., 2005). Relativamente aos estabilizantes, estes são utilizados para fornecer ao alimento a consistência desejada, sendo amplamente utilizados em produtos com uma consistência instável perante agentes externos, como por exemplo gelados. Outra função desta mesma classe consiste na prevenção de evaporação e deterioração de óleos voláteis utilizados com o intuito de dar sabor ao alimento. Um exemplo de origem natural é a goma de carragenina (E407) (Branen et al., 2005).

Já em “outros agentes” incluem-se aditivos que são adicionados aos alimentos com algum propósito específico, mas que não reúnem critérios que permitam a inclusão nos grupos anteriormente descritos. Aqui, incluem-se agentes quelantes, enzimas, agentes anti-espuma, lubrificantes, entre outros (Upadhyay & Pandey, 2012; Saltmarch, 2013).

O *Codex Alimentarius* representa uma comissão internacional, estabelecida em 1963, pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Organização de Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO) e é responsável por desenvolver orientações a nível global relativas a segurança alimentar, consistindo a sua atuação em estabelecer normas harmonizadas e aplicáveis internacionalmente (“World Health Organization,” n.d.).

A monitorização do uso de aditivos alimentares é realizada pelo Comité Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares e Contaminantes (JECFA), o qual procede à avaliação da segurança dos aditivos desde 1956 e, ainda, recomenda que todos os países verifiquem o nível de consumo total de cada aditivo específico para assegurar que a sua ingestão não ultrapasse os valores determinados na Dose Diária Admissível (DDA) (Prado & Godoy, 2003; “Codex Alimentarius Commission - Procedural Manual,” n.d.; Upadhyay & Pandey, 2012).

No que concerne à comercialização de um novo género alimentar ou aditivo, a FDA e a EFSA surgem como as primeiras entidades responsáveis pelo estudo da segurança do seu uso, a partir da realização de ensaios de toxicologia (Carochó et al., 2014; Martins et al., 2016). Desta forma, quando o aditivo em questão é reconhecido como seguro passa a designar-se como substância “GRAS” (Geralmente Reconhecido Como Seguro) (Branen et al., 2005).

No processo de aprovação de uma dada substância, a FDA considera vários critérios para a avaliação da segurança, dos quais: a composição e propriedades inerentes à substância,

a quantidade habitualmente utilizada, os efeitos imediatos e a longo prazo, e outros fatores relacionados com segurança. Quando o composto é aprovado, é definida de imediato uma margem de segurança dentro da qual não são esperados efeitos adversos (“Overview of Food Ingredients, Additives & Colors,” n.d.). Já quando se pretende aprovação de um novo produto alimentar, os responsáveis pela produção do mesmo devem reunir informação de âmbito científico, tal como, composição nutricional, padrões de consumo esperados, a segurança relativa a efeitos de toxicidade e efeitos alergénicos possíveis, que deve ser entregue à EFSA para análise (Boer & Aalt, 2018).

Os aditivos alimentares permitidos encontram-se listados pela sua denominação e pelos seus respetivos DDA no regulamento 1129 de 2011 (European Parliament and Council, 2011), sendo que os valores são definidos e introduzidos pelo JECFA (FAO & WHO, 2014). A DDA é um valor estimado que diz respeito à quantidade de um aditivo que se encontra presente num género alimentar, que pode ser ingerido por via oral numa determinada dose diária sem um risco considerável para a saúde e é expresso em mg/kg (miligrama de substância ativa por kilograma de massa corporal) (Branen et al., 2005).

Embora uma substância seja aprovada para comercialização, torna-se essencial que o seu consumo seja monitorizado e reavaliado, a fim de determinar possíveis alterações nas suas margens de consumo (DDA) ou para acrescentar informação revelante relativa à mesma (Branen et al., 2005; Martins & Ferreira, 2017).

1.1.1. A subclasse dos corantes

Esta subclasse remonta às civilizações mais antigas que procuravam substâncias disponíveis na natureza que fornecessem alguma cor aos alimentos, melhorando a sua aparência (Hutchings, 1994; Mapari et al., 2010; Sharma, 2014). Para tal, eram utilizadas substâncias de origem animal, vegetal ou mineral como especiarias e condimentos que gradualmente foram substituídos por corantes artificiais (Sharma, 2014).

O uso de substâncias artificiais, especificamente os corantes artificiais, iniciou-se em 1856 quando se sintetizou o primeiro corante derivado da hulla (carvão mineral), denominado mauveína (**Figura 1**), com coloração púrpura e que foi desenvolvido casualmente por William Henry Perkin através da oxidação da anilina (Hutchings, 1994; Sharma, 2014; Neri-Numa et al., 2017).

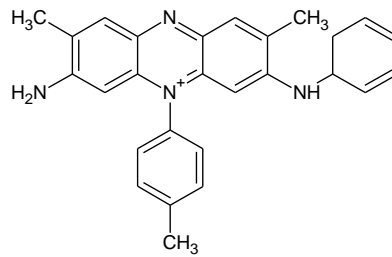


Figura 1. Estrutura química do corante mauveína.
(Desenho obtido na aplicação ACD/ChemStech).

Desde então, surgiram milhares de novos corantes derivados do alcatrão da hulla, tendo sido incorporados, posteriormente, em diversos produtos alimentares, tais como queijos, gelados, massas, vinhos, entre outros (Neri-Numa et al., 2017).

Quando um alimento é apresentado ao consumidor é previamente analisado sensorialmente, havendo uma perceção instantânea do cheiro, textura e cor, ou seja, das características organoléticas. A aparência visual é a primeira sensação que gera expectativas acerca da palatabilidade de um alimento, característica esta que se considera um fator crucial para a aceitação e consumo deste produto (Prado & Godoy, 2003; Wadhwa & Capaldi-Phillips, 2014; Martins et al., 2016).

A aplicação de um corante num produto alimentar contribui, essencialmente, para garantir uma boa aparência e melhorar as características organoléticas, assegurando consequentemente, o interesse e a satisfação por parte dos consumidores (Lin et al., 2018). Desta forma, os corantes permitem a preservação da cor ao longo do tempo (através da inibição da descoloração do alimento devido à exposição a fatores externos nomeadamente, luz, ar, temperaturas extremas e condições de armazenamento); a correção das variações na cor que ocorrem de forma natural; e ainda, a intensificação da coloração natural de um produto alimentar (Hutchings, 1994; Sharma, 2014; Amchova et al., 2015).

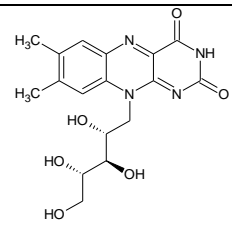
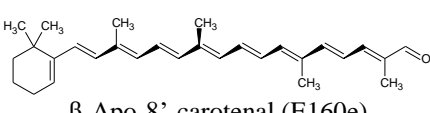
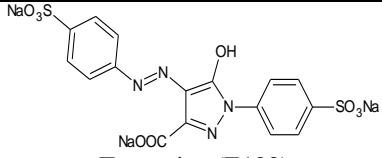
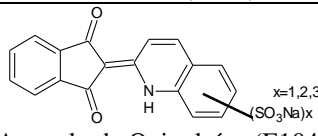
Esta classe de aditivos revela-se muito útil para a indústria alimentar, uma vez que está comprovado que o tipo e intensidade da cor afeta diretamente a perceção do alimento por parte do consumidor (Wadhwa & Capaldi-Phillips, 2014; Lin et al., 2018). Outro aspeto revelante, numa perspetiva fisiológica, é o facto de que, perante um alimento visualmente agradável (aspeto no qual a cor é a característica organolética mais revelante), o sistema digestivo é estimulado ocorrendo a libertação fisiológica de saliva e síntese de diversos péptidos necessários para que a digestão ocorra mais facilmente, já que ajuda na quebra

dos nutrientes, considerando-se, desta forma, uma vantagem (Hutchings, 1994; Wadhera & Capaldi-Phillips, 2014).

O organismo responsável na União Europeia pela regulação dos aditivos para uso alimentar é a EFSA, enquanto que nos Estados Unidos da América é a FDA. Estes últimos definem corante como “qualquer corante, pigmento ou substância que quando adicionada ou aplicada num alimento, medicamento ou cosmético, ou no corpo humano, tem a capacidade (sozinho ou através de reação com outras substâncias) de fornecer cor” (“Overview of Food Ingredients, Additives & Colors,” n.d.). A regulação tem como princípios básicos assegurar que os alimentos que contêm substâncias corantes sejam seguros para o consumo e verificar que são utilizados apenas ingredientes aprovados e listados como seguros (“Overview of Food Ingredients, Additives & Colors,” n.d.; Lewis, 1989; Sharma, 2014; Martins et al., 2016).

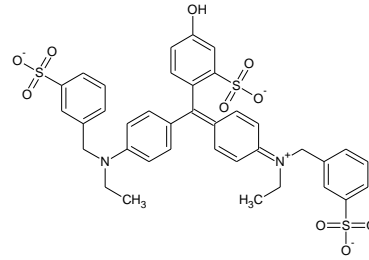
Atualmente, para classificar os diversos tipos de corantes aplica-se um critério relativamente à solubilidade dos mesmos: substância lipossolúvel e substância solúvel em água (**Tabela 1**) (Tang et al., 2014; Amchova et al., 2015; Neri-Numa et al., 2017).

Tabela 1. Classes de corantes e respetivas estruturas químicas.

Solubilidade	Classe	
Solúvel em água	Naturais	 <p>Riboflavina (E101)</p>
	Semissintéticos	 <p>β-Apo-8'-carotenal (E160e)</p>
	Artificiais	
	Compostos Azo	 <p>Tartrazina (E102)</p>
	Derivados de Quinoflona	 <p>Amarelo de Quinoleína (E104)</p>

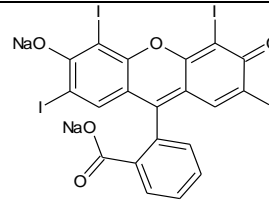
(Desenhos das estruturas químicas obtidos na aplicação ACD/ChemSketch)

Derivados de
Trifenilmetano



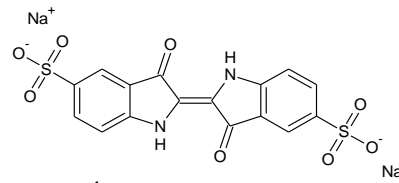
Verde Rápido (E143)

Xantenos



Eritrosina (E127)

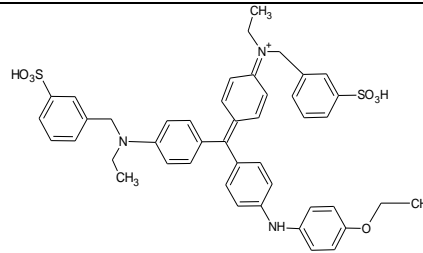
Índigos



Índigo carmine (E132)

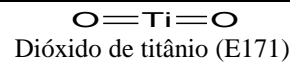
Lipossolúvel

Orgânicos



Azul brilhante (E133)

Inorgânicos



As substâncias insolúveis são designadas por pigmentos e são caracterizadas por serem insolúveis na maioria dos solventes. No entanto, possuem propriedades que lhes proporcionam um grande potencial corante. Estas podem, ainda, dividir-se em pigmentos inorgânicos e orgânicos, sendo que os pigmentos inorgânicos apresentam uma gama de cores limitada (dióxido de titânio branco, carbonato de cálcio branco, óxido de ferro vermelho e carbono adsorvente preto) e os pigmentos orgânicos são sais conjugados de tipo azo que existem numa ampla variedade de cores (Amchova et al., 2015). Estes últimos, quando conjugados com alumínio são designados por lacas (pigmento insolúvel em água) e formam-se perante precipitação de um corante solúvel, em água, sobre um substrato insolúvel de alumínio hidratado, sendo um exemplo o corante azul brilhante (E133) (Barrows et al., 2003). As lacas são consideradas como corantes modificados e

são aplicados em sistemas não aquosos tais como gelados, cremes para pastelaria, entre outros (Wong, 1998; Herbst & Hunger, 2006).

A classe das substâncias solúveis pode ainda ser dividida em subclasses: corantes naturais, corantes semissintéticos/idênticos aos naturais e corantes artificiais. Tal como a própria denominação indica, os corantes naturais são obtidos diretamente da natureza, sendo extraídos de matrizes naturais tais como plantas, fungos, ou até mesmo insetos (Bento et al., 2015), não sofrendo qualquer alteração química, e sendo por isso, também designados por biocorantes (Sharma, 2014). Nestes podem incluir-se: riboflavina (E101), clorofila (E140), carotenos (E160a), betalaína (E162) e antocianinas (E163). Estes corantes são caracterizados por possuírem uma baixa estabilidade, dependente das condições de pH e temperatura (Carocho et al., 2014; Amchova et al., 2015; Rodriguez-Amaya, 2018). Por outro lado, os corantes semissintéticos/sintéticos idênticos aos naturais são sintetizados industrialmente, mas com intuito de mimetizar os produtos obtidos da natureza, como por exemplo o β -apo-8'-carotenal (E160e) ou a cantaxantina (E161g) (Wrolstad & Culver, 2012). Por fim, os corantes artificiais são totalmente obtidos por via sintética não sendo, de nenhuma forma, encontrados na natureza. Estes podem dividir-se em diferentes subclasses, das quais fazem parte, por exemplo, a tartrazina (E102) e o azul patente (E131) (Carocho et al., 2014). Estes últimos, contrariamente aos corantes de origem natural, são conhecidos por uma estabilidade elevada, que permite que a cor permaneça intacta por mais tempo nos produtos em que são incorporados (Carocho et al., 2015; Neri-Numa et al., 2017).

Os corantes artificiais podem ainda ser divididos em 5 classes distintas relativamente à caracterização química: os compostos azo, os derivados de quinofalona e de trifenilmetanos, os xantenos e os índigos (Carocho et al., 2014).

Os compostos azo são caracterizados por conter o grupo funcional $R - N = N - R'$, nos quais R e R' podem conter um grupo arilo ou alquilo. A sua coloração abrange várias tonalidades devido à presença do grupo azo, que ao reagir com os anéis aromáticos, provoca deslocalização eletrónica e, posteriormente, absorção de luz na zona do visível (Prado & Godoy, 2003). Entre os mais conhecidos encontram-se: tartrazina (E102; DDA = 7,5 mg/kg de massa corporal), amarelo crepúsculo (E110; DDA = 2,5 mg/kg de massa corporal), carmoisina (E122; DDA = 4 mg/kg de massa corporal), amaranto (E123; DDA = 0,8 mg/kg de massa corporal) e vermelho allura (E129; DDA = 7 mg/kg de massa

corporal), aos quais se recorre frequentemente na indústria alimentar, devido à sua capacidade de preservação da cor e baixo custo (Tang et al., 2014; Amchova et al., 2015). Relativamente aos derivados de quinofalona, estes são provenientes do amarelo de quinoleína (corante artificial pertencente à classe das quinofalonas) e identificado como E104 (DDA = 10 mg/kg de massa corporal) (Martins et al., 2016). O amarelo de quinoleína apresenta-se como um corante químico artificial sintetizado através da mistura de dissulfatos, monossulfonatos e trissulfonatos de sódio (Carocho et al., 2014).

A classe de corantes derivados do trifenilmetano, também designados por corantes triarilmetano, apresentam uma estrutura básica de três radicais arilo (geralmente grupos fenólicos) ligados a um átomo de carbono central. Podem conter grupos sulfónicos que lhes conferem uma solubilidade considerável em água (Prado & Godoy, 2003). Esta classe abrange uma grande variedade de compostos, dos quais os mais conhecidos são o azul brilhante (E133; DDA = 10 mg/kg de massa corporal), verde rápido (E143; ADI = 25 mg/kg de massa corporal), azul patente (E131; DDA = 15 mg/kg de massa corporal) e preto brilhante (E151; DDA = 1 mg/kg de massa corporal) (Carocho et al., 2014; Martins et al., 2016).

Em relação aos corantes xantenos, estes são derivados do grupo xanteno e os mais recorrentes são eritrosina (E127; DDA= 0,1 mg/kg de massa corporal), fluoresceína, eosinas e rodaminas (Carocho et al., 2014; Martins et al., 2016).

Por fim, a classe dos corantes índigos provêm de uma matriz natural, o arbusto *Indigofera tinctoria* L.. Este corante surge como um dos mais utilizados pelo homem durante as épocas do Renascimento, sendo utilizado para o tingimento ou coloração de roupas sendo que, já nessa época, sofria transformações para que pudesse ser aplicado. Após extração, especificamente do glicósido do 3-hidroxi-indol, era hidrolisado, oxidado e dimerizado, para se obter o corante azul índigo (Shiozer & Barata, 2007). Foi posteriormente sintetizado, pela primeira vez, pela empresa Bayer, em 1878, e desde então, passou a ser utilizado apenas o corante sintetizado artificialmente (Markakis, 2012; Carocho et al., 2014). Assim, nesta classe destaca-se o corante índigo carmina (E132; DDA = 5 mg/kg de massa corporal) (Ugaz, 1997; Carocho et al., 2014; Martins et al., 2016).

1.2. A revitalização da “era natural”

O aumento da população e o desenvolver de novas técnicas a nível de cultivo agrícola, industrial e tecnológico, levou à necessidade de desenvolver meios para controlar e

minimizar os riscos que poderiam surgir do aumento da produção alimentar, que visava um fabrico em grandes quantidades, assim como a possibilidade de inúmeros transportes para chegar ao consumidor (Popkin & Kenan, 2016; Asioli et al., 2017; Govindan, 2018). Tendo em conta que um alimento natural é isento de conservantes artificiais e outros químicos, encontra-se exposto a agentes externos com uma probabilidade acrescida de deterioração química e física (Carocho et al., 2015). Assim, em 1950 iniciou-se um período de industrialização que visava a adição de aditivos alimentares com o objetivo de aumentar o tempo de vida de um produto e manter a qualidade e segurança nutricional dos alimentos (Carocho et al., 2015; Román et al., 2017).

A ideia relativamente à indústria alimentar sofreu uma revolução no ano 1980, a qual se tem estendido até aos dias de hoje, já que o consumidor procura por produtos alimentares naturais com o mínimo de processamento possível, e ainda, por uma produção biológica, intitulados de alimentos “limpos” (Asioli et al., 2017; Martins & Ferreira, 2017; Sun et al., 2017). Esta preferência deve-se, principalmente, à preocupação pelos efeitos adversos possíveis provenientes, não só da composição do próprio alimento, mas também da incorporação de aditivos alimentares artificiais e de fatores inerentes à sua produção e manuseamento, como por exemplo a presença de pesticidas, resíduos de poluição, antibióticos, entre outros (Asioli et al., 2017; Martins & Ferreira, 2017; Sun et al., 2017). Todos estes fatores referidos, seja direta ou indiretamente, têm a potencialidade de, no seu conjunto, afetar a qualidade final do alimento e, conseqüentemente, gerar efeitos no metabolismo (Martins & Ferreira, 2017).

Uma investigação realizada pela empresa Nielsen, que efetua estudos de mercado, com a denominação de “Nielsen global health and wellness survey” concluiu que para os consumidores, os atributos mais importantes na escolha de um produto alimentar são a frescura, a naturalidade e o mínimo processamento possível associado, relacionando-se desta forma, o “natural” com o “saudável” (Nielsen, 2015; Román et al., 2017), ideia esta que está de acordo com um estudo realizado por Moscato & Machin, 2018, no qual os participantes associam positivamente o consumo da “comida natural” com saúde e bem estar.

Os consumidores que optam por uma alimentação baseada em alimentos de origem natural, são considerados universalistas já que além da preocupação a nível alimentar, demonstram preocupações relativamente ao ambiente (alteração na camada de ozono, bactérias multirresistentes, pesticidas, hormonas, entre outros), isto porque os meios de

produção e a composição inerente ao alimento afeta não só o próprio consumidor mas também o ambiente (Martins & Ferreira, 2017; Sun et al., 2017). Além disso, o desenvolvimento tecnológico que possa comprometer a qualidade dos alimentos e consequentemente a própria saúde, despoleta alguma ansiedade ao consumidor (Devcich et al., 2007; Dickson-Spillmann et al., 2011).

Com isto, verifica-se uma crescente preocupação por parte das indústrias agroalimentares e assiste-se ao desenvolvimento de produtos sob condições biológicas; à substituição dos aditivos artificiais por aditivos naturais; e ao desenvolvimento de processos que permitam a inclusão de compostos naturais nos alimentos através da biotecnológica alimentar (Asioli et al., 2017; Martins & Ferreira, 2017). Todas estas mudanças visam a obtenção de alimentos que proporcionem uma alimentação nutricionalmente rica, variada e natural que irá, desta forma, ao encontro das preferências alimentares dos consumidores (Dickson-Spillmann et al., 2011; Carcho et al., 2015; Martins et al., 2016; Martins & Ferreira, 2017; Román et al., 2017).

Relativamente aos aditivos alimentares, os adoçantes e os corantes são os que apresentam uma maior controvérsia relativamente à relação de risco/benefício de utilização para a saúde do consumidor, sendo questionada por estes a necessidade da sua utilização, já que, no último caso, tem surgido a possibilidade de “colorir os alimentos com alimentos” (Bearth et al., 2014; Munawar & Jamil, 2014). Já para o produtor, a sua aplicação é de grande utilidade pois, no caso dos corantes, além da garantia da preservação ou intensificação da cor, recorre-se, também frequentemente, a estes compostos, como meio de marketing, a fim de criar produtos inovadores que suscitem a curiosidade, tais como a criação do ketchup de marca Heinz com coloração verde (Munawar & Jamil, 2014; Spence, 2015; Lin et al., 2018).

1.2.1. Vantagens da utilização de matrizes naturais

A investigação relacionada com a obtenção de aditivos alimentares de origem natural tem aumentado exponencialmente, devido ao fato de os consumidores preferirem cada vez mais alimentos com o mínimo de processamento (Asioli et al., 2017; Moscato & Machin, 2018). Com isto, o consumidor tem-se focado, essencialmente, na verificação da origem dos mesmos, preferindo os de origem natural sem adição de compostos químicos artificiais (Carcho et al., 2015; Román et al., 2017).

A preferência por estes alimentos, não sujeitos a processamento, pode ser explicada, principalmente, pela composição variada em compostos químicos bio-ativos disponíveis, contrariamente ao que ocorre em produtos refinados, processados e industrializados, os quais perdem uma quantidade variada de componentes, tais como fibras, vitaminas, nutrientes, minerais entre outros, durante os processos de produção/processamento e, conseqüentemente, apresentam um maior teor em hidratos de carbono simples, sal e gorduras, adicionando-lhe, desta forma, uma grande quantidade de calorias comparando com a quantidade de nutrientes que lhe está associado (Rodríguez-Roque et al., 2015; Moubarac et al., 2017).

Em primeiro lugar, além destes compostos possuírem um valor nutritivo por si só, ou através de sinergismos com outros compostos, apresentam várias atividades farmacológicas tais como antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, entre outras, que trazem benefícios relativos à saúde, aliados à segurança do seu consumo (Carocho et al., 2015; Neri-Numa et al., 2017). Estes efeitos podem estar relacionados, em parte, com a quantidade de compostos fenólicos presentes, que apresentam inúmeras propriedades bioativas, e podem evitar o uso de alguns aditivos artificiais, tais como conservantes, devido à sua atividade antisséptica (Carocho et al., 2014; Burdock & Wang, 2017). Um exemplo de um aditivo com dupla funcionalidade é a paprica, substância que além da sua potencialidade como corante apresenta teores apreciáveis de vitamina C, assim como a riboflavina que é uma fonte de vitamina B (Burrows, 2009). Assim, além de todos os benefícios inerentes, os compostos provenientes de matrizes naturais podem ser aplicados como aditivos alimentares com diversas finalidades, tais como corantes, conservantes, entre outros (Munawar & Jamil, 2014; Tan, Lim, & Lee, 2014; Arici et al., 2016; Gras et al., 2017; Pisoschi et al., 2018).

O facto dos aditivos artificiais terem vindo a ser substituídos por aditivos naturais advém não só da pressão por parte do consumidor, mas também, devido as desvantagens associadas ao uso de aditivos artificiais (Bakowska-Barczak, 2005; Arici et al., 2016). Alguns estudos realizados têm concluído que um numero elevado de aditivos artificiais usados na indústria alimentar, têm a potencialidade de provocar toxicidade, efeitos adversos a longo prazo, demências e patologias como cancro (Martins & Ferreira, 2017). Uma das classes mais propensas a provocar toxicidade e, por isso, uma das mais estudadas e controladas é a classe dos corantes azo que, após metabolismo pela microbiota intestinal leva à formação de metabolitos com atividade carcinogénica (Sharma, 2014; Amchova et

al., 2015), além dos emulsionantes, frequentemente utilizados na indústria alimentar, que promovem alterações na microbiota e disfunção na parede intestinal, com consequentes alterações metabólicas (Zhang, Ju, & Zuo, 2018).

Relativamente aos compostos naturais, o risco de provocar toxicidade implica um estudo mais aprofundado do que para compostos artificiais dado que, os princípios ativos das matrizes naturais variam de acordo com vários fatores: a família da planta, as condições impostas no seu crescimento, a parte da planta do qual é isolado o composto, sendo também importante salientar que um determinado composto poder ser isolado de espécies distintas com diferentes teores de compostos (Sharma, 2014; Burdock & Wang, 2017). Apesar de haver uma incerteza relativamente ao risco, deve ter-se em conta o velho ditado de que “a dose faz o veneno”, tanto para compostos naturais como para artificiais (Burdock & Wang, 2017). Deste modo, torna-se necessário o desenvolvimento de novas técnicas e processos que possibilitem não só a extração de substâncias de matrizes naturais, mas também, que permitam estabilizar as substâncias já descobertas. Torna-se, também, importante estudar novas espécies que sejam fonte de tais substâncias, aproveitando desta forma, todos os recursos disponíveis na natureza (Shiozer & Barata, 2007; Martins et al., 2016).

1.2.2. As antocianinas como corantes naturais

As antocianinas são usadas para fins de coloração há mais de 100 anos, onde era utilizado o extrato da pele da uva, por exemplo, para intensificar a cor do vinho (Wrolstad & Culver, 2012). São uma classe de substâncias de origem natural e responsáveis pela maioria das cores visíveis na natureza, essencialmente presentes em frutos, flores, vegetais, folhas e cereais, sendo na União Europeia classificadas por E163 (Durge et al., 2013; Mojica et al., 2017; Cassidy, 2018).

As antocianinas extraídas e isoladas de matrizes naturais, podem ser utilizadas em diversas indústrias, sendo procuradas mais frequentemente pela indústria alimentar como corantes, a fim de potenciar a cor aos produtos alimentares (Carocho et al., 2015). Estas são consideradas não apenas como uma substância corante, mas sim como uma classe, devido a terem sido encontradas e caracterizadas mais de 600 tipos de antocianinas na natureza, que apresentam uma tonalidade que varia do azul ao vermelho (Wrolstad & Culver, 2012; Carocho et al., 2015).

As antocianinas pertencem ao grande grupo dos flavonoides, sendo consideradas os pigmentos solúveis em água mais revelantes para extração de matrizes naturais (Mojica et al., 2017). O facto de apresentarem uma solubilidade consideravelmente alta em água, torna-as úteis e bastante procuradas por parte da indústria alimentar devido à facilidade de incorporação das mesmas em produtos alimentares de base aquosa (Bakowska-Barczak, 2005; Durge et al., 2013; Cassidy, 2018).

Relativamente à sua caracterização química, as antocianinas são provenientes de uma estrutura básica de 3 anéis de forma C6-C3-C6, que se define como uma porção aglicona, designada por catião flavílico (**Figura 2**). Quando associado a grupos químicos, nas posições R, passa a designar-se por antocianidina. Apesar de existirem cerca de 25 antocianidinas caracterizadas, as mais comuns são cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina, pelargonidina e malvidina, indicadas na **Figura 3**, sendo que, os derivados da cianidina são os que surgem com maior frequência (Shiozer & Barata, 2007; Markakis, 2012; Mojica et al., 2017).

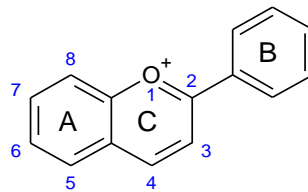


Figura 2. Estrutura química do catião flavílico.
(Adaptado de Wrolstad & Culver, 2012)

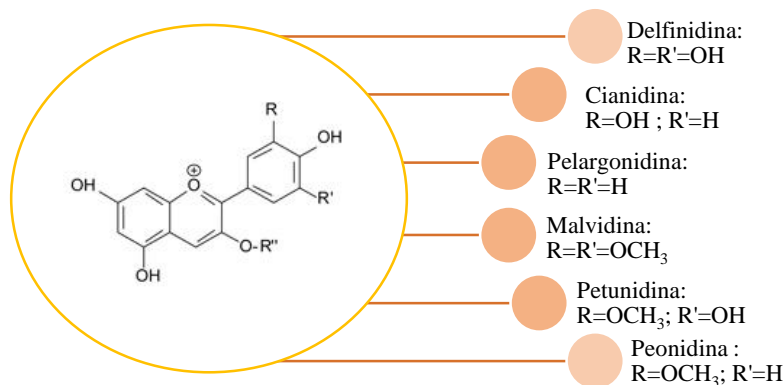


Figura 3. Tipos de antocianinas.
(Fonte: Bakowska-Barczak, 2005)

Quando as antocianidinas são glucolisadas ou aciladas, por uma moléculas de açúcar ou por um ácido aromático ou alifático, respetivamente, passam a designar-se por antocianinas (Mojica et al., 2017). Além de não serem encontradas na natureza na sua

forma aglicona, as antocianidinas são caracterizadas por apresentar uma solubilidade muito inferior às correspondentes antocianinas (Bakowska-Barczak, 2005; Durge et al., 2013).

A classe das antocianinas é muito ampla, dada a diversidade de grupos químicos que lhes podem estar associados. Deste modo, podem conter substituintes no anel B, principalmente grupos hidroxilo e grupos metoxilo; podem apresentar substituintes de moléculas de açúcar na posição 3 e 5 (como indicado na **Figura 2**) e ainda, ligações éster entre açúcares e ácidos orgânicos, resultantes da acilação dos substituintes presentes nos açúcares (Bakowska-Barczak, 2005; Wrolstad & Culver, 2012).

As antocianinas são moléculas muito instáveis e suscetíveis de serem degradadas. A sua estabilidade depende de vários fatores, dos quais: a sua estrutura química, a concentração na qual se encontram (ao aumentar, permite uma maior estabilidade devido à auto-associação), fatores externos aos quais estão expostas como pH, temperatura, luz, oxigénio, presença de enzimas e água, outros flavonoides, proteínas ou iões metálicos (Bakowska-Barczak, 2005; Wrolstad & Culver, 2012; Rodriguez-Amaya, 2016; Mojica et al., 2017). Assim, torna-se essencial desenvolver métodos de extração e isolamento das mesmas, que permitam manter ou aumentar a sua estabilidade, para uma posterior aplicação, como por exemplo, incorporação em produtos alimentares, cosméticos; ou mesmo, o isolamento para fins farmacológicos (Joaquín-Cruz et al., 2015; Rodriguez-Amaya, 2016).

Relativamente ao fator pH, as antocianinas são, geralmente, estáveis para valores de pH entre 1 e 4, e sofrem degradação acima de um pH de 7 (Mojica et al., 2017). Além da estabilidade, também a coloração é afetada pelo valor de pH, já que este ao destabilizar o sistema conjugado de ligações duplas presente no anel do catião flavílico, origina uma diminuição progressiva da coloração, com o aumento de pH (Shiozer & Barata, 2007; Wrolstad & Culver, 2012; Rodriguez-Amaya, 2018), conforme descrito na **Figura 4**.

***Rubus ulmifolius* Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos**

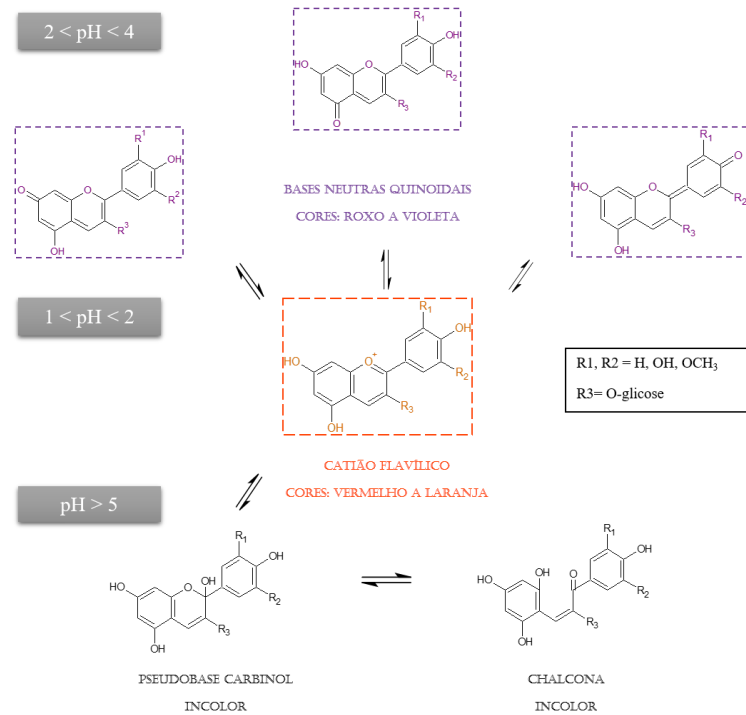


Figura 4. Esquema representativo da interconversão estrutural das formas dominantes de antocianinas em fase aquosa, dependente de pH, e respetiva cor apresentada. (Adaptado de Wrolstad & Culver (2012))

Assim, como representado na **Figura 4**, para valores de pH entre 1 e 2, a forma predominante é o catião flavílico, o qual apresenta uma gama de cores do vermelho ao laranja; para valores de pH entre 2 e 4, predominam as bases neutras quinoidais, que apresentam uma coloração azul-roxo; já para valores de pH a cima de 5, valores nos quais o catião flavílico sofre um ataque nucleófilo por uma molécula de água (hidratação), predominam, essencialmente, a pseudobase carbinol e as chalconas (ambas bastante instáveis e com coloração nula). O facto destas últimas apresentarem uma coloração nula, deve-se à inibição da absorção de luz visível, resultante da destabilização provocada no sistema conjugado de ligações duplas do anel pirano do catião flavílico (Shiozer & Barata, 2007). No entanto, apesar dos inúmeros fatores que criam instabilidade nestas moléculas, há também diversas características estruturais que permitem aumentar a estabilidade química (Bakowska-Barczak, 2005; Markakis, 2012; Wrolstad & Culver, 2012; Mojica et al., 2017).

Em termos da sua estrutura química, prevê-se que um maior número de substituições aciladas com grupos cinâmicos, gerem uma maior estabilidade, sendo que entre os grupos mais frequentes encontram-se os ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico (Bakowska-Barczak, 2005; Gras et al., 2012; Rodriguez-Amaya, 2016; Nemetz et al.,

2017). O efeito de estabilidade relativo à acilação, pode ser explicado pelo efeito protetor por parte do grupo acilo, que protege os anéis da estrutura básica da antocianina de possíveis ataques nucleófilos, que potenciam a descoloração da antocianina (Tan et al., 2014).

Além dos grupos químicos referidos, também os grupos hidroxilo e metoxilo têm um efeito significativo na estabilidade, de modo que, um maior número de grupos hidroxilo favorece a estabilidade das antocianinas, enquanto que, um aumento no número de grupos metoxilo diminui a mesma (Shiozer & Barata, 2007). Outro fator que leva à estabilização destas moléculas é a co-pigmentação, que consiste na condensação com outros compostos presentes na planta (pigmentos poliméricos), como por exemplo outros compostos fenólicos, que permitem um aumento da estabilidade e, conseqüentemente, potenciam uma maior intensidade da coloração apresentada pela antocianina (Shiozer & Barata, 2007; Wrolstad & Culver, 2012).

A presença de antocianinas numa espécie pode conferir-lhe uma diversidade de cores, estando estas não só dependentes do valor do pH do meio, mas também da composição química das antocianinas. Desta forma, com o aumento de grupos hidroxilo, estas moléculas vão exibir uma tonalidade azulada, enquanto que, com grupos metoxilo vão exibir tons de vermelho (Delgado-Vargas et al., 2000; Shiozer & Barata, 2007; Wrolstad & Culver, 2012).

Muitas indústrias têm revelado interesse na utilização das antocianinas para incorporação nos produtos alimentares não só pelo seu potencial corante, mas também devido ao facto das mesmas acrescentarem valor bioativo ao alimento e, conseqüentemente, benefícios para a saúde (Tan et al., 2014; Joaquín-Cruz et al., 2015; Mojica et al., 2017; Braga et al., 2018).

Estes compostos demonstram ter várias atividades com interesse farmacológico, sendo que a atividade antioxidante surge com grande relevância, prevenindo a oxidação de biomoléculas como lípidos e proteínas e desta forma, diminuir o risco de ocorrência de doenças cardiovasculares, neuronais, cancerígenas, diabetes e demências (Shiozer & Barata, 2007; Durge et al., 2013; Arici et al., 2016). Muitos são os efeitos benéficos estudados, entre os quais se encontram o efeito anti-inflamatório, anti carcinogénico, antimicrobiano, entre outros (Mojica et al., 2017; Neri-Numa et al., 2017).

1.3. *Rubus ulmifolius* Schott como uma fonte promissora

Atualmente, verifica-se um crescente interesse por espécies silvestres, devido ao facto de estas espécies representarem fontes de diversos nutrientes e compostos bioativos, fundamentais para o bom funcionamento do organismo, fazendo delas uma potencial estratégia para diversificar e enriquecer a alimentação diária (Morales et al., 2013).

Uma vez que o seu desenvolvimento não exige condições muito específicas, estas tornaram-se um recurso natural inesgotável e, muitas vezes, desvalorizado pelo Homem. Assim, devem ser desenvolvidas estratégias no sentido da recuperação e revalorização destas espécies para futuras aplicações em vários setores da indústria, nomeadamente, cosmética, farmacêutica e alimentar. A indústria alimentar tem a possibilidade de tirar partido de todos os benefícios inerentes ao seu consumo e também, desenvolver produtos alimentares funcionais (Fernández-Ruiz et al., 2015; Emilia & Accame, 2016).

De todas as espécies silvestres existentes na natureza, podem destacar-se as espécies pertencentes ao género *Rubus*, género este que integra 12 subgéneros e inúmeras espécies (Deighton et al., 2000).

A espécie *Rubus ulmifolius* Schott (**Figura 5**) é uma das espécies que fazem parte deste género, pertence à família Rosaceae e é conhecida por silva-brava ou amora-silvestre e em inglês por *Elmleaf Blackberry* (Deighton et al., 2000; Martins et al., 2014; Emilia & Accame, 2016). O nome atribuído ao género *Rubus*, deriva do latim *ruber* (vermelho) referindo-se, desta forma, à cor dos frutos das espécies que inclui, neste caso à fase imatura da amora (**Figura 5E**). Já o nome da espécie, *ulmifolius* deve-se à semelhança com as folhas da espécie Ulmeiro (*Ulmus minor*).

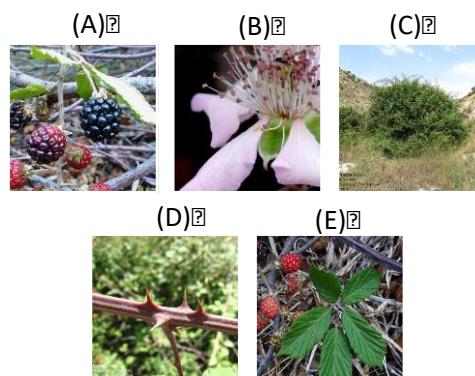


Figura 5. Imagens ilustrativas das características de frutos, flores e folhas da *Rubus ulmifolius* Schott: frutos (A); inflorescência (B); arbusto (C); espinhos (D); folhas (E).
(Fonte: Flora-on e A pitata - Flora de alicate)

Esta espécie encontra-se amplamente distribuída pela Europa, especificamente na Península Ibérica, Ásia e Norte de África (Martins et al., 2014; Reidel et al., 2016). Apesar da planta se desenvolver mais eficazmente em solos húmidos, desenvolve-se também em solos secos. A localização do seu crescimento é, no entanto, condicionante para algumas características morfológicas da planta, como por exemplo, o tamanho do folíolo, que em zonas mais secas se torna mais reduzido (Emilia & Accame, 2016).

Esta espécie caracteriza-se por ser um arbusto silvestre (**Figura 5C**) revestido por espinhos (**Figura 5D**). Do seu caule principal derivam vários ramos lenhosos e eretos, a partir dos quais se desenvolvem as inflorescências. Estas são do tipo cacho, com um cálice formado por 5 sépalas de onde emergem inúmeros estames, e por sua vez, as corolas são constituídas por 5 pétalas enrugadas e de forma oval, apresentando tonalidades brancas e cor de rosa (**Figura 5B**) (Emilia & Accame, 2016; Reidel et al., 2016). Já as folhas, apresentam uma cor verde escura na página superior e cor branca na página inferior, por ser revestida por pequenos pelos (Reidel et al., 2016). São folhas compostas, encontrando-se divididas em 3 a 5 folíolos que derivam do pecíolo (**Figura 5E**) (Emilia & Accame, 2016).

A sua época de floração ocorre entre maio e junho, a partir do qual começam a desenvolver-se os frutos (**Figura 5A**), designados por amora preta (ou *blackberry*, em inglês). Estes são um agregado de 20 a 30 pequenas drupas, carnudas e suculentas, apresentando cada uma delas uma semente. De acordo com a fase de maturação a sua cor altera de verde a preto, quando se encontra totalmente maduro. Estes frutos podem ser consumidos crus ou em produtos alimentares derivados, tais como compotas, sumos e licores. Destes podem ainda ser extraídas fontes de nutrientes e compostos bioativos para produção de suplementos dietéticos, incorporação em produtos alimentares ou cosméticos (Emilia & Accame, 2016; Reidel et al., 2016).

Esta espécie é reconhecida pelas suas propriedades medicinais, tais como expetorante, antisséptica, diurética, anti-inflamatória, antioxidante, antiespasmódica, antipirética, anti-helmíntica e adstringente, sendo desta forma utilizada tradicionalmente para o tratamento, atenuação de sintomas ou prevenção de patologias (Dall'Acqua et al., 2008; Martins et al., 2014; D'Agostino et al., 2015; Hajaji et al., 2017), como descrito na **Tabela 2**. Todas estas propriedades medicinais têm sido relacionadas com a composição fitoquímica desta espécie, especificamente, os compostos fenólicos, elagitaninos e ácido ascórbico (Barros

***Rubus ulmifolius* Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos**

et al., 2010; Oszmiański et al., 2015; Emilia & Accame, 2016; Reidel et al., 2016), que lhe proporcionam um elevado potencial antioxidante (Sousa et al., 2016).

Tabela 2. Usos tradicionais de diferentes partes da planta *Rubus ulmifolius* Schott.

Parte da planta	Forma de preparação	Uso tradicional	Referências
Flor	Decocção de botões florais	- Diarreia, dor menstrual, sintomas da menopausa, doenças de fígado, hipertensão, diabetes, aftas, gengivite	[1,3,4]
	Outros:	- Distúrbios gastrointestinais, diarreia, processos inflamatórios	
Fruto	Licor	- Problemas digestivos	[4,5,6]
	Consumo em fresco e cru	- Sistema digestivo, dor de estômago, dor abdominal, diarreia	
	Sumo	- Asma, anemia	
	Extratos	- Prevenção de proliferação celular anormal	
	Outros	- Antidiarreico, prevenção de deficiência em ferro	
Folha	Infusão (via oral)	- Adstringente, anti-inflamatória, hipogluceante, espasmolítica -Hipotensão	[3,4,7,8,9,10,11,12]
	Decocção (via tópica)	- Inflamações no olho e boca	
	Decocção (via oral)	- Diarreia, hemorroidas, inflamação intestinal	
	Outros	- Feridas cutâneas, queimaduras e acne; - Hipertensão, diabetes; - Tosse	
Raiz	Decocção	- Alopecia	[3]

[1]Barros et al., 2010; [2]Martins et al., 2014; [3]Reidel et al., 2016; [4]Pinela et al., 2017; [5]Morales et al., 2013; [6]Wang et al., 2008; [7]Panizzi et al., 2002; [8]Emilia & Accame, 2016; [9]Sisti et al., 2008; [10]Hajaji et al., 2017; [11]Flamini et al., 2002; [12]González et al., 2010;

1.3.1. Compostos fenólicos não antociânicos

Vários são os estudos que se têm focado em determinar o perfil fitoquímico desta planta, assim como associá-lo às suas atividades bioativas, especialmente, atividade antioxidante (Oszmiański et al., 2015; Reidel et al., 2015). Para tal, torna-se essencial a determinação do teor em compostos fenólicos (Dall'Acqua et al., 2008; Oszmiański et al., 2015; Reidel et al., 2015; Akkari et al., 2016).

A composição fitoquímica apresentada por estes frutos, assim como a consequente atividade antioxidante, não dependem apenas da espécie em questão, mas também de

muitos outros fatores, como as condições climáticas nas quais se deu o seu desenvolvimento. É essencial considerar tais fatores neste contexto, dado serem espécies silvestres que estão sujeitas a condições ambientais muito variadas, principalmente, o grau de maturação no qual o fruto se encontrava na colheita, como verificado por ensaios realizados por Wang & Lin, 2000, D'Agostino et al., 2015, Reidel et al., 2016. Os ensaios consistiram em análises comparativas da composição de frutos e flores desta espécie, em diferentes tempos de maturação, concluindo que há, efetivamente, uma discrepância significativa no teor de compostos apresentados (Reidel et al., 2016) de tal forma que os frutos com menor maturação (cor verde) apresentaram um teor reduzido em antocianinas e mais elevado em compostos fenólicos totais. Contrariamente, quando o fruto se encontrava maduro (cor preta), o teor em antocianinas era consideravelmente superior e mais reduzido em ácidos fenólicos totais (Wang & Lin, 2000).

Os compostos fenólicos são compostos essenciais para as plantas em termos fisiológicos e metabólicos, estando envolvidos em diversas funções: sensoriais (cor, aroma, sabor, adstringência), estruturais, desenvolvimento, reprodução, entre outras. Estes compostos resultam do metabolismo secundário das plantas e são também sintetizados quando a planta é sujeita a condições de stresse (condições de temperatura extremas, exposição intensa a raios ultravioleta, ataque por insetos, entre outros) (Kong et al., 2003; Giada, 2013; Pinela et al., 2017).

Relativamente aos frutos de *R. ulmifolius*, está descrito na literatura que as suas classes maioritárias de compostos fenólicos são os flavonoides e os elagitaninos (Flamini et al., 2002; Oszmiański et al., 2015; Reidel et al., 2015; Sousa et al., 2016; Lorenzo et al., 2017). Em termos químicos, os compostos fenólicos são caracterizados por conterem um anel aromático com pelo menos um grupo hidroxilo podendo, no entanto, estar associado a outros grupos funcionais, glucósidos ou proteínas (Deighton et al., 2000). Análises computacionais de relação estrutura-atividade demonstram que a atividade antioxidante destes compostos está associada com o número de grupos hidroxilo aromáticos livres, de tal forma que, quanto maior o número, maior é o potencial antioxidante (Deighton et al., 2000).

Relativamente aos flavonoides, estes são caracterizados por conterem uma baixa massa molecular e uma estrutura base de 15 carbonos (C6-C3-C6), ou seja, contêm dois anéis benzénicos unidos por um heterocíclico. Geralmente, o primeiro anel designa-se por A, o segundo por B e o heterocíclico por C (**Figura 6**) (Angelo & Jorge, 2007; Xie et al.,

2018). A partir da sua estrutura base podem surgir várias subclasses de flavonoides: chalconas, flavonas, flavanonas, flavonóis, isoflavonas, flavanóis e antocianinas (Xie et al., 2018).

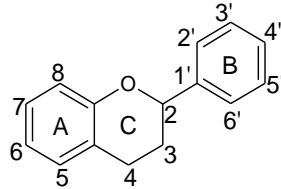


Figura 6. Estrutura base C6-C3-C6 dos flavonoides.

Na **Tabela 3** estão listados os compostos fenólicos não antociânicos identificados em frutos de *R. ulmifolius*. Relativamente aos flavonoides caracterizados nos frutos, destacam-se os derivados de quercetina e kaempferol. Outros compostos fenólicos encontrados pertencem à classe de ácidos fenólicos e taninos hidrolisáveis (Dall'Acqua et al., 2008; Kaume et al., 2012; Ruiz-Rodríguez et al., 2014).

Tabela 3. Compostos fenólicos não antociânicos identificados em frutos de *R. ulmifolius*.

Classe	Subclasse	Compostos isolados	Referências
Flavonoides	Derivados de quercetina	Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido	[1,2]
		Quercetina-3- <i>O</i> -galatósido	[2]
		Quercetina- <i>O</i> -hexósido	[3]
		Quercetina-3- <i>O</i> -rutinósido	[2,4]
		Quercetina-3- <i>O</i> -pentósido	[4]
		Quercetina-3- <i>O</i> -ramnósido	[1,4]
		Quercetina-3- <i>O</i> -glucoronido	[1]
		Quercetina-3- <i>O</i> -metoxi-hexósido	[3]
		Quercetina-3- <i>O</i> -(6'-(3-hidroxi-3-metilglutaril)-galactósido	[3]
		Quercetina-3- <i>O</i> -β-D glucuronido	[1]
		Tilirósido	[1]
Flavonois	Derivados do kaempferol	Kaempferol	[1]
		Kaempferol -3- <i>O</i> -pentósido	[4]
		Kaempferol -3- <i>O</i> -rutinósido	[4]
		Kaempferol -3- <i>O</i> -glucósido-ramnósido-7- <i>O</i> -ramnósido	[4]
		Kaempferol -3- <i>O</i> -glucoronido	[4,5]
		Kaempferol -3- <i>O</i> -(6''- <i>p</i> -coumaroil)-β-D-glucopiranósido	[5]
		Kaempferol -3- <i>O</i> -(6''-feruloil)-β-D-glucopiranósido	[5]
		Kaempferol -3- <i>O</i> -β-D-galactósido	[1]
		Kaempferol -3- <i>O</i> -α-L-arabinopiranósido	[1]
		Kaempferol -3- <i>O</i> -β-D-glucósido	[1]

***Rubus ulmifolius* Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos**

Flavonas		Apigenina-3- <i>O</i> -glucurónido	[4]
		Luteolina-7- <i>O</i> - β -D-glucurónido	[1,4]
Taninos hidrolisáveis	Elagitaninos	Casuarinina	[4]
		Lambertianina C	[4]
Ácidos fenólicos	Derivados de ácido hidroxicinâmico	Ácido <i>p</i> -cumárico	[4]
		Ácido ferúlico	[1,5]
		Ácido cafeico	[5]
		Cafeoil-hexósido	[4]
		Ácido clorogênico (ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico)	[1,4,5]
		Ácido neoclorogénico (ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico)	[1,5]
		Ácido criptoclorogénico (ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico)	[1,5]
		Ácido 1,4- <i>O</i> -dicafeoilquínico	[1]
		Ácido gálico	[1,6]
		Derivados de ácido hidroxibenzoico	Ácido elágico
		Ácido elágico pentósido	[6]
		Ácido elágico ramnósido	[4]
		Ácido elágico metilpentósido	[4]

[1]Panizzi et al., 2002; [2]Ruiz-Rodríguez et al., 2014; [3]Oszmiański et al., 2015; [4]Oszmiański et al., 2015; [5]Dall'Acqua et al., 2008; [6]Fazio et al., 2013

Os taninos podem ser classificados em taninos condensados ou taninos hidrolisáveis, de acordo com os grupos químicos que os formam. Desta forma, denominam-se por taninos condensados (proantocianidinas) quando resultam da polimerização de unidades de flavan-3-ol ((epi)catequina) ou unidades de flavan 3,4-diol (leucoantocianinas), através da oxidação dos anéis aromáticos; e por taninos hidrolisáveis quando resultam da copolimerização com moléculas de glucose e unidades de ácido gálico (galotaninos) ou elágico (elagitaninos) (Battestin et al., 2004; Angelo & Jorge, 2007). Nos frutos desta espécie também foram identificados derivados glucósidos do ácido elágico (Kaume et al., 2012; Oszmiański et al., 2015), assim como nos extratos de sementes destes mesmos frutos a presença de dois elagitaninos (galoil-HHDP glucósido e galoil-bis-HHDP glucósido) (Fazio et al., 2013).

1.3.2. Antocianinas

Tendo em conta todos os compostos fenólicos anteriormente descritos, as antocianinas são uma subclasse de flavonoides mais encontrada em frutos, vegetais e flores, proporcionando-lhes uma coloração roxo-vermelha-azul, fator este que contribui para a coevolução da planta através da interação animal-planta o que, por sua vez, permite a dispersão de sementes e a polinização (Kong et al., 2003).

De entre todas as antocianinas encontradas na natureza, as mais frequentemente caracterizadas são os derivados glucósidos da cianidina (**Tabela 4**), que têm sido amplamente estudados para aplicação na indústria alimentar devido ao seu potencial corante (Bakowska-Barczak et al., 2005; Arici et al., 2016;). A cianidina-3-*O*-glucósido e seus derivados são as que têm causado maior impacto devido ao seu efeito antioxidante, provavelmente relacionado com os grupos hidroxilo que se encontram ligados ao anel aromático. O interesse por estes últimos derivados é bastante revelante não só pela potencialidade corante mas também no âmbito farmacológico (Kong et al., 2003; Ding et al., 2006; Kaume et al., 2012; Xie et al., 2018).

Tabela 4. Antocianinas isoladas dos frutos da *R. ulmifolius*.

Antocianidina	Antocianina	Referência
Cianidina	Cianidina-3-xilósido	[1]
	Cianidina-3-glucósido	[1,2]
	Cianidina-3-rutinósido	[1]
	Cianidina-3-diglucósido	[1]
	Cianidina-3-glucosil-rutinósido	[1]
	Cianidina-3-dioxaloilglucósido	[1]
	Cianidina-3-(3'-malonil)-glucósido	[1]
	Cianidina-3-(6'-malonil)-glucósido	[1]
Pelargonidina	Pelargonidina-3-rutinósido	[3]

[1] Oszmiański et al., 2015; [2]Ruiz-Rodríguez et al., 2014; [3] Ruiz-Rodríguez et al., 2014

Os autores Oszmiański et al. (2015) caracterizaram cerca de 14 compostos fenólicos nos frutos da *R. ulmifolius* (solvente de extração: metanol/água (50:50, v/v) acidificado com 1% de ácido acético), entre os quais 8 pertenciam a derivados da antocianidina cianidina. De outro modo, os autores Ruiz-Rodríguez et al. (2014), apenas caracterizaram um derivado de cianidina (cianidina-3-glucósido) e um derivado de pelargonidina (pelargonidina-3-rutinósido) num extrato obtido com o solvente de extração metanol/água (50:50 v/v) acidificado com 1% de ácido fórmico. Uma análise realizada num sumo de frutos de *R. ulmifolius* por Deighton et al. (2000), revelou uma composição maioritária em derivados da cianidina e, em menor quantidade, derivados da pelargonidina, peonidina e delfinidina. Também as sementes de fruto de *R. ulmifolius* foram caracterizadas pelos autores Fazio et al. (2013), identificando apenas a cianidina-3-glucósido.

1.3.3. Outros constituintes químicos

Apesar dos compostos fenólicos serem os compostos maioritários e aos quais se atribui uma maior importância, os frutos de *R. ulmifolius* contêm compostos pertencentes a

outras classes, que foram igualmente caracterizados e revelam ser alvo de grande interesse.

Como descrito anteriormente, estes frutos têm sido alvo de inúmeras pesquisas devido ao seu potencial corante. No entanto, outra característica organoléptica destes frutos tem despertado interesse por parte da indústria, isto é, o seu aroma característico. Neste sentido, vários estudos científicos têm sido realizados no sentido de apurar o seu perfil aromático (D'Agostino et al., 2015).

À semelhança de outras espécies pertencentes ao género *Rubus*, os compostos maioritários são os ésteres e álcoois alifáticos, seguindo-se os compostos terpénicos e aromáticos e, ainda, os aldeídos e cetonas (D'Agostino et al., 2015; Reidel et al., 2016). Num estudo realizado por D'Agostino et al. (2015), com o objetivo de determinar também o conteúdo em compostos voláteis, evidenciaram-se como compostos maioritários o 2-metil-butanal, o etanol, a 2,3-butanodiona, o trans-2-hexenal, a 3-hidroxi-2-butanona, o 1-hexanol, o 1-octanol e o ácido metilbutanóico. O composto *p*-cimen-8-ol, conhecido também como “cherry propanol”, que apresenta um intenso aroma frutado, foi também identificado nestes frutos.

Quanto aos compostos terpénicos, os autores Reidel et al. (2016) destacaram os sesquiterpenos (15C), nomeadamente o α -copaeno. Estes compostos estão associados a aromas doces e florais e são ainda responsáveis por proteger a fruta contra agentes patogénicos e insetos.

Da classe dos ésteres, compostos maioritariamente caracterizados nestes frutos, foram encontrados: ésteres alifáticos (acetato de etilo, butanoato de hexilo, 3-metil-3-hexen-1-ilo, butanoato, hexanoato de hexilo, hexanoato de metilo, hexanoato de etilo, (*E*)-2-hexenilbutirato, octanoato de etilo, isovalerato de isopentilo, 2-metilbutil-3-metilbutirato, ésteres de metilo e etilo dos ácidos hexanóico, octanóico, decanóico e dodecanóico, ésteres aromáticos (benzoato de butilo), assim como derivados do éster 3- hidroxilo (D'Agostino et al., 2015; Reidel et al., 2016).

Como álcoois alifáticos foram caracterizados outros 4 compostos (4-metil-1-pentanol, 3-etil-4-metil-pentanol, 3-etilfenol, 2-heptanol) e como álcoois C₆ identificaram-se 3 compostos (1-hexanol, 3-hexen-1-ol, 2-hexen-1-ol). O composto 2-heptanol encontra-se descrito noutras espécies como determinante de um aroma doce e frutífero, contribuindo também para o aroma destes frutos (D'Agostino et al., 2015).

Como indicado, dentro da classe dos aldeídos e cetonas foram caracterizados um menor número de compostos, dos quais 2 cetonas (2-heptanona e 5,5-dimetil-2-ciclopenten-1-ona) e 2 aldeídos (nonanal e decanal) (D'Agostino et al., 2015; Reidel et al., 2016).

Foram ainda encontrados 5 derivados de furano, dos quais: furfural, 5-metilfurfural, dihidro-2(3H)-furanona, 2-furilmetanol (ácido furfurílico) e 5-hidroximetilfurfural (D'Agostino et al., 2015).

Apesar da atividade antioxidante destes frutos ser maioritariamente associada à sua composição em compostos fenólicos, é pertinente salientar o seu teor em vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis) e vitamina C (ácido ascórbico e ácido desidroascórbico), duas vitaminas que participam sinergicamente na interrupção da cadeia de peroxidação lipídica, neutralizando os radicais que causam danos celulares (Morales et al., 2013; Sánchez-Mata & Tardío, 2016), como indicado na **Figura 7**. Desta forma, contribuem ativamente para a atividade antioxidante associada aos frutos de *R. ulmifolius*.

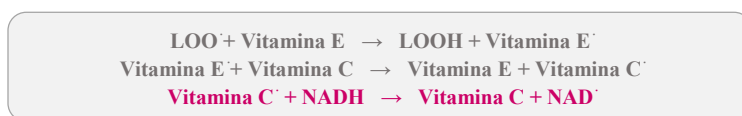


Figura 7. Esquema representativo da atividade antioxidante sinérgica da vitamina E e C na peroxidação lipídica. LOO[·](radical peróxido); LOOH (hidroperóxidos de lípidos) (Fonte: Sánchez-Mata & Tardío, 2016)

Relativamente à vitamina E (tocoferol), foram encontradas todas as isoformas, ou seja, α -tocoferol, δ -tocoferol, γ -tocoferol e β -tocoferol quantificadas em concentrações semelhantes, há exceção deste último que foi encontrado em concentrações inferiores (Morales et al., 2013).

Quanto à vitamina C, foi determinado que os frutos apresentam quantidades equivalentes em vitamina C (AA) e na sua forma oxidada, ácido desidroascórbico (DHAA) (Morales et al., 2013; Ruiz-Rodríguez et al., 2014).

As concentrações destas vitaminas demonstram, no entanto, ser bastante variáveis nestes frutos. Tal facto deve-se às condições climáticas a que estão expostas as espécies silvestres durante o seu desenvolvimento, condições estas que são determinantes para a estabilidade destes compostos (Ruiz-Rodríguez et al., 2014).

Dentro da classe de ácidos orgânicos, foram também caracterizados: ácidos oxálico, málico, cítrico e succínico e, embora em menor concentração, o ácido fumárico (Morales et al., 2013). Também alguns ácidos orgânicos possuem capacidade para atuar sinergicamente na cadeia de peroxidação lipídica, dado que conseguem inibir a oxidação

do ácido ascórbico através da deslocalização de carga eletrónica proveniente de radicais peróxido (LOO[•]), com a consequente neutralização dos mesmos (Morales et al., 2013). É importante salientar que o ácido quínico é formado por hidrólise do ácido clorogénico, que também foi caracterizado nestes frutos por Dall'Acqua et al. (2008) e Oszmiański et al. (2015).

Outra classe detetada frequentemente nestes frutos são os triterpenos (30C), tendo sido caracterizados os seguintes: ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido tormêntico, ácido euscáfico, ácido 23-hidroxi-tormêntico, ácido 2 α -hidroxi-ursólico, ácido 28-glucósido-ursolico, ácido 28-glucósido-tormêntico, ácido 28-glucósido euscáfico e o éster triterpénico nigaichigósido (Panizzi et al., 2002).

A composição de um alimento em ácidos gordos, demonstra ser um fator importante no contexto nutricional, dado que, os ácidos gordos insaturados (monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA)), nomeadamente os ácidos gordos pertencentes à classe de ómega 3 e ómega 6, estão relacionados com a prevenção e redução de doenças cardiovasculares, processos inflamatórios e doenças autoimunes (Morales et al., 2013; Elagizi et al., 2018; Wang et al., 2018). Já um consumo elevado de ácidos gordos saturados (SFA) demonstrou ser mais prejudicial que a totalidade de gorduras consumida e também, associado a elevados níveis de colesterol plasmático, com a consequência de aumento de probabilidade de ocorrência de patologias nas artérias coronárias. Assim, estes frutos demonstraram ter uma alta composição em ácidos gordos, sendo que dos MUFA, se destaca o ácido oleico (C18:1n9) e dos PUFA, o ácido linoleico (C18:2n6) e o ácido α -linolénico (C18:3n3) (Morales et al., 2013). Nas sementes isoladas, previamente transformadas em farinha, o ácido linoleico surge igualmente como composto maioritário (Fazio et al., 2013). É recomendada uma ingestão equilibrada de ácidos gordos insaturados e ácidos gordos saturados, de forma a regular o colesterol plasmático, de tal forma que a relação PUFA/SFA surge, neste contexto, como indicadora da qualidade de um alimento. Recomenda-se que este valor seja superior a 0,45 (Dias et al., 2012; Morales et al., 2013), limite dentro do qual se encontra o valor para estes frutos (Morales et al., 2013).

1.3.4. Propriedades bioativas

As plantas medicinais foram desde sempre, consideradas como uma potencial fonte de princípios ativos terapêuticos, especialmente em povoações rurais onde se encontram

facilmente recursos naturais como plantas aromáticas, vegetais e frutos e em países em desenvolvimento, onde os recursos naturais se apresentam mais acessíveis e com custo mais reduzido (Hajaji et al., 2017).

A classe de compostos mais estudada num contexto farmacológico é a classe dos compostos fenólicos, que têm demonstrado várias bioatividades, tais como antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória, entre outras, tendo um impacto positivo na prevenção e cura de diversas patologias (**Figura 8**) (Bravo, 1998; Ding et al., 2006; Oszmiański et al., 2015).

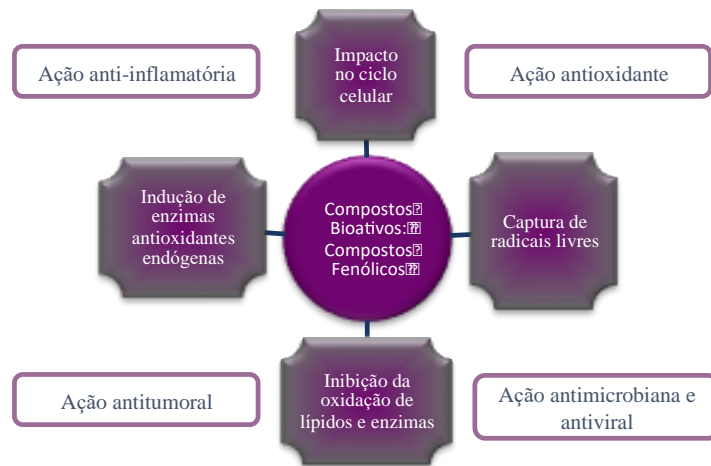


Figura 8. Esquema representativo das bioatividades de compostos fenólicos.
(Fonte: Sánchez-Mata & Tardío, 2016)

Uma correlação linear positiva entre o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante apresentada nestes frutos, medida através de ensaios ORAC (Capacidade de Absorvância de Radicais de Oxigénio) foi comprovada por vários autores (Wang & Lin, 2000; Dall'Acqua et al., 2008; Oszmiański et al., 2008; Akkari et al., 2016; Sousa et al., 2016), que consideram que estes frutos são, comparativamente a outros, os que apresentam uma maior capacidade antioxidante (Dall'Acqua et al., 2008). A bioatividade destes frutos foi verificada através da sua capacidade de neutralizar o radical peróxido (ROO), o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical hidroxilo (OH) e o oxigénio singlete ($1O_2$), que são os agentes envolvidos nas cascatas dos processos oxidativos. Estas espécies reativas afetam biomoléculas como lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, resultando em danos celulares persistentes, que por vezes, os sistemas de defesa endógenos não conseguem resolver, originando várias patologias (Deighton, et al., 2000; Wang & Lin, 2000; Kong et al., 2003; Wang et al., 2008; Hajaji et al., 2017).

Um estudo realizado por Akkari et al. (2016), determinou uma correlação bastante positiva entre o teor de compostos fenólicos, nomeadamente, flavonoides e taninos, e a atividade antioxidante de diferentes extratos dos frutos de *R. ulmifolius*. Verificaram, também, uma correlação linear positiva entre os mesmos compostos e uma atividade anti-helmíntica. Esta atividade foi testada em extratos de frutos, recorrendo a diferentes solventes, para verificar a capacidade destes sobre o parasita *Haemonchu contortus*. Estes extratos provaram, efetivamente, ter um efeito anti-helmíntico contra este parasita, pela capacidade de eliminar e/ou inibir a replicação destes, verificando-se resultados mais promissores nos extratos aquoso e metanólico do fruto, relativamente ao extrato obtido com clorofórmio e *n*-hexano. Tal facto revela que as moléculas que exerceram essa atividade seriam polares, como é o caso dos compostos fenólicos (Akkari et al., 2016).

Também Fazio et al. (2013) estudaram a atividade anti-inflamatória e antioxidante em extratos de sementes de frutos de *R. ulmifolius* e concluíram que estes exercem uma atividade significativa. Para tal, verificou-se a capacidade deste extrato para inibir a libertação de NO (óxido nítrico), induzida por um lipopolissacárido (LPS), numa linha de macrófagos RAW264.7, de onde se obteve uma percentagem de inibição de 60%. O NO consiste num marcador de processos inflamatórios, que é sintetizado quando ocorre indução da iNOS (óxido nítrico-sintase induzida), normalmente por citocinas e lipopolissacárido. No mesmo contexto, os autores verificaram também a capacidade para inibir a libertação da quimiocina CCL20, proteína mediadora dos processos inflamatórios libertada pelos macrófagos, de onde se obteve uma inibição de 90%. Desta forma, pode verificar-se que o extrato metanólico exerceu uma atividade anti-inflamatória significativa. Já no sentido de analisar a atividade antioxidante do mesmo extrato metanólico, os autores determinaram o EC₅₀ do efeito captador de radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), que revelou ser muito inferior ao valor de EC₅₀ apresentado pelo antioxidante utilizado como controlo, Trolox, sendo, neste contexto, EC₅₀ a concentração de extrato que possui 50% de atividade antioxidante. Desta forma, os autores concluem que as atividades apresentadas poderão estar relacionadas com o teor em compostos fenólicos, presentes no extrato metanólico da semente.

O desenvolvimento de resistência por bactérias, parasitas e outros microrganismos tem levado a uma preocupação crescente pela procura de outras fontes de moléculas com potencial bioativo. Neste contexto, as matrizes naturais têm despoletado interesse pela sua composição química, da qual fazem parte uma ampla diversidade de compostos que

ao atuar sinergicamente, demonstram exercer um potencial bioativo maior do que compostos sintéticos, com mecanismos específicos em moléculas alvo (Quave et al., 2012). E ainda, pelo facto de serem compostos biodegradáveis, que após metabolização resultam em produtos não tóxicos, assegurando o controlo destas infeções sem causar toxicidade, nas concentrações previstas de utilização (Hajaji et al., 2017).

A atividade antimicrobiana surge como uma das bioatividades mais estudadas nos frutos de *R. ulmifolius*, verificando-se resultados satisfatórios. Geralmente, os resultados são distintos no que concerne às bactérias Gram-negativos e Gram-positivos, sendo que, as Gram-negativos demonstram ser mais resistentes a óleos e extratos metanólicos, dado conterem uma membrana exterior constituída por um lipopolissacárido hidrofóbico, que protege contra agentes externos (Hajaji et al., 2017). Ainda assim, apesar desta característica inerente às bactérias, num estudo efetuado por Hajaji et al. (2017), o extrato metanólico destes frutos demonstrou ser efetivo tanto para *Escherichia coli* (Gram-negativo), como para *Streptococcus agalactiae* (Gram-positivos). O mesmo foi verificado por Panizzi & Morelli (2002), que realizaram um ensaio contra as bactérias Gram-positivos *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, e contra as bactérias Gram-negativos *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Este estudo evidenciou, ainda, uma atividade antifúngica para a levedura *Saccharoyce cerevicae* e para o fungo *Candida albicans*, sendo que dos compostos isolados testados, os ácidos gálico e ferúlico foram os que demonstraram uma maior atividade.

Também os trofozoítos de género de ameboides (protozoário), *Acanthamoeba castellanii* Neff, demonstraram ser sensíveis ao extrato metanólico obtido destes frutos, com um valor de IC₅₀ de 61,785 µg/mL, embora superior ao do fármaco controlo, clorhexidina (IC₅₀ = 2,643 µg/mL) (Hajaji et al., 2017), sendo IC₅₀ a concentração de extrato que apresenta 50% de atividade amebicida. Apesar de não haver estudos complementares, o extrato metanólico da *R. ulmifolius* sugere ter um potencial amebicida.

Ding et al. (2006) efetuaram estudos onde testaram a atividade quimioterapêutica destes frutos. Em primeiro lugar, determinaram uma potente atividade antioxidante perante ROS (espécies reativas de oxigénio), espécies que se encontram diretamente relacionadas com o desenvolvimento de proliferações anormais, especificamente contra H₂O₂ e O₂⁻, que foram ambas inibidas. Além das espécies reativas, estudaram a atividade da cianidina-3-O-glucósido em proteínas que são fulcrais no processo de tumorigénese: AP-1 (fator de transcrição regulador da expressão génica), NF-kB (fator nuclear kB, um fator de

transcrição), COX-2 (cicloxiogenase 2; enzima determinante em processos inflamatórios) e TNF- α (fator de necrose tumoral), e concluíram que este composto diminuiu os níveis de todas estas proteínas. Os resultados promissores obtidos pelos autores, levaram também à realização de um ensaio para testar a atividade desta antocianina perante as cascatas de sinalização envolvidas na ativação dos fatores anteriormente descritos, essencialmente da cascata via MAPK (proteína cinase ativada pelo mitogene) (**Figura 9**). Nesta cascata estão envolvidas as cinases ERK, JNK e p38, que por sua vez, levam ao aumento da atividade da proteína AP-1 e do fator NF- κ B com a consequente ativação do fator de necrose tumoral TNF- α e da COX-2 (Kim & Choi, 2010). Os autores comprovaram que esta antocianina suprime a fosforilação do ERK, JNK e p38, e, inibindo a sua ativação, e sendo estas iniciadoras da uma segunda cascata, a progressão da proliferação celular é inibida (Kaume et al., 2012), assim como a metastização, como evidenciado pela **Figura 9**, provavelmente devido às suas propriedades antioxidantes.

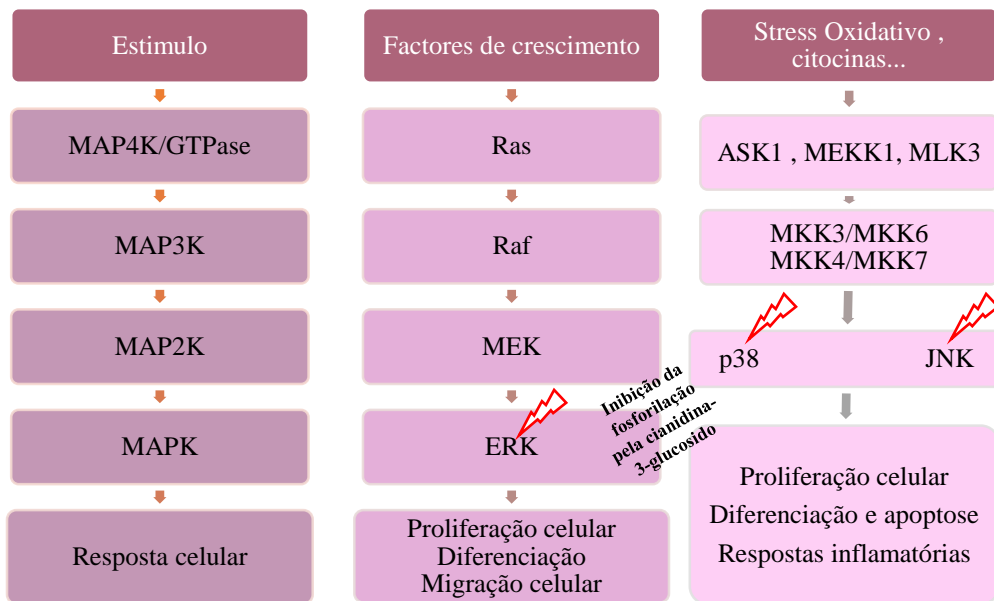


Figura 9. Cascata MAPK (proteína cinase ativada pelo mitogene).

MAPK - Proteína - cinases ativadas por mitógenos; Ras/raf- Proteína-cinase específica de serina/treonina; Mek- Cinase MAPK; ERK- Proteína cinase regulada por *sinais* extracelulares; Ask1- Cinase 1 *reguladora* do sinal de *apoptose*; *MLK3*- mixed-lineage cinase 3 ; MKK- MAP cinase cinase; p38 - Proteína-cinase ativada por mitógenos; JNK- Cinase c-Jun N-terminal.

(Fonte : Ding et al., 2006; Kim & Choi, 2010 e Kaume et al., 2012)

Além de todas as atividades a nível molecular descritas *in vitro*, a cianidina-3-O-glucósido demonstrou também inibir a proliferação de uma linha celular de carcinoma

***Rubus ulmifolius* Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos**

pulmonar, enquanto que em ensaios *in vivo* exerceu um efeito quimioterapêutico, ao diminuir o tamanho do tumor em ratinhos (Ding et al., 2006).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo principal as seguintes etapas: i) caracterização do ponto de vista nutricional e da composição química dos frutos de *Rubus ulmifolius* Schott (amora silvestre) recolhidos no distrito de Bragança, assim como, avaliar as suas propriedades bioativas; ii) otimizar a obtenção de um extrato rico em antocianinas a partir dos seus frutos, para utilização como corante natural e iii) estudos de validação do potencial corante do extrato rico em antocianinas, efetuado por incorporação do corante natural num produto alimentar.

O plano de trabalho encontra-se esquematizado na **Figura 10**.

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

- ✓ Determinação do valor nutricional dos frutos através de metodologias oficiais de análise de alimentos (AOAC);
- ✓ Determinação da composição química, analisando o teor em açúcares livres, ácidos gordos, ácidos orgânicos e tocoferóis;
- ✓ Determinação de compostos fenólicos não-antociânicos e antociânicos;
- ✓ Avaliação de diferentes propriedades bioativas, tais como atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica) e potencial citotóxico;
- ✓ Otimização do processo de extração de corantes naturais dos frutos de *R. ulmifolius*, através da metodologia de superfície de resposta;
- ✓ Avaliação do potencial corante, antimicrobiano e citotóxico do extrato obtido após processo de otimização;
- ✓ Incorporação do extrato rico em compostos antociânicos num produto de pastelaria – “donuts”.

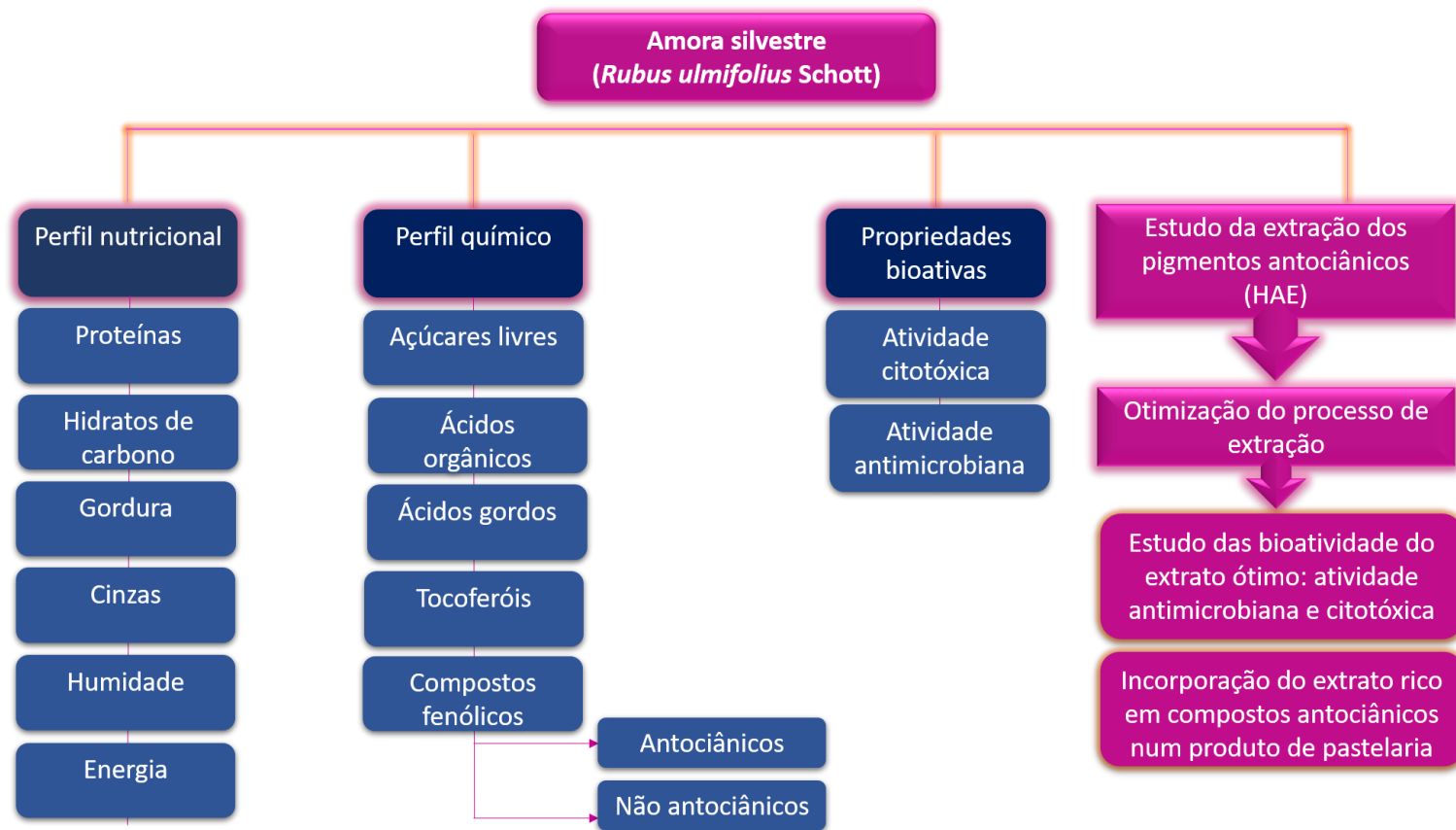


Figura 10. Representação esquemática dos objetivos do presente trabalho

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparação da amostra

Os frutos de *Rubus ulmifolius* Schott (Rosaceae) utilizados para este estudo foram recolhidos em setembro de 2017, em Bragança (nordeste de Portugal). Após a recolha, as amostras de frutos (200 g) foram congeladas e, posteriormente, desidratadas através de um processo de liofilização (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EUA). Seguidamente as amostras foram trituradas e armazenadas em local fresco e seco ao abrigo de luz, para posteriores análises.

3.2. Padrões e reagentes

3.2.1. Análise química

Os solventes *n*-hexano 95%, acetonitrilo 99%, etanol absoluto (99,9%) e acetato de etilo 99,98%, todos de grau HPLC, foram adquiridos na Fisher Scientific (Lisboa, Portugal) e o solvente metanol de grau analítico, foi adquirido na Pronalab (Lisboa, Portugal). Os restantes solventes usados, igualmente de grau analítico foram os seguintes: éter etílico (Lab-Scan, Lisboa, Portugal); tolueno e ácido sulfúrico (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA).

A mistura padrão com 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (C4-C24; norma 47885-U) foi adquirida na empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), assim como outros isómeros individuais de ácidos gordos, padrões de açúcares (D(-)-frutose D(+)-sacarose, D(+)-glucose, D(+)-trealose, D(+)-melezitose e D(+)-rafinose pentahidratada), padrões de ácidos orgânicos (L(+)-ácido ascórbico; ácido cítrico; ácido málico; ácido oxálico; ácido succínico; ácido fumárico e ácido quinico) e padrões de tocoferóis (isoformas $-\alpha$, $-\beta$, $-\lambda$ e $-\delta$). Relativamente aos padrões dos compostos fenólicos não antociânicos utilizados (apigenina-6-*C*-glucósido, ácido cafeico, ácido elágico, ácido clorogénico, hesperetina, luteolina-7-*O*-glucósido, naringenina, quercetina-3-*O*-rutinósido, quercetina-3-*O*-glucósido, taxifolina, ácido rosmarínico) foram adquiridos na Extrasyntheses (Genay Cedex, França) e os compostos antociânicos (cianidina-3-*O*-glucósido, peonidina-3-*O*-glucósido e pelargonidina-3-*O*-glucósido) foram adquiridos na empresa Polyphenols (Sandines, Norway). A água foi tratada previamente à sua utilização pelo sistema de purificação Milli-Q-Water (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, EUA).

3.2.2. *Estudo de bioatividades*

Análise da atividade citotóxica: O sêrum fetal de bovino (SFB), a L-glutamina, a solução salina de Hank's (HBSS), a solução de penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100 mg/mL, respetivamente) e o meio DMEM (meio de cultura para células animais (Dulbecco Modified Eagle)) foram adquiridos na empresa Hyclone (Logan, Utah, EUA). O ácido acético, elipticina, sulforodamina B (SRB), ácido tricloroacético (TCA) e Tris foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A água foi tratada como referido anteriormente.

Análise na atividade antimicrobiana: O Mueller-Hinton agar (MHB) foi obtido na Biolab® (Hungria). O composto p-iodonitrotetrazolium chloride (INT) foi adquirido da Panreac Applichem (Barcelona, Espanha). Os antibióticos imipenem e vancomicina foram obtidos da Hikma farmacêutica (Portugal SA) e a Ampicilina da Janssen farmacêutica (Bélgica).

3.3. *Determinação do valor nutricional dos frutos de *Rubus ulmifolius**

A composição em macronutrientes dos frutos de *R. ulmifolius* foi obtida através de metodologias oficiais de análise de alimentos (AOAC, 2016). Para tal, foi determinado o teor de proteína, gordura, hidratos de carbono, cinzas, humidade e energia.

O teor em proteínas ($N \times 6.25$) foi obtido pelo método macro-Kjeldahl (AOAC 991.02), o qual se baseia na quantidade de azoto presente na amostra. Para tal, adiciona-se ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) à amostra (0,5 g) ocorrendo, desta forma, a digestão da matéria orgânica e conseqüente formação de um sal inorgânico, o sulfato de amónio $(NH_4)_2SO_4$, no qual é retido o azoto. De seguida, alcaliniza-se a solução por adição de hidróxido de sódio (NaOH), que potencia a libertação de azoto na forma de amoníaco, NH_3 . O amoníaco é, de seguida, destilado e recolhido numa solução de ácido conhecido, neste caso, H_2SO_4 (0,1 M). Por fim, é feita uma titulação com NaOH (0,1 M), utilizando um indicador vermelho de metilo, que permite quantificar o azoto presente na amostra (AOAC 991.02).

Os lípidos foram determinados através da extração de uma massa conhecida de amostra (3 g), num aparelho de Soxhlet, para a qual se utilizou como solvente de extração o éter de petróleo a uma temperatura de aproximadamente 80 °C, durante 7 horas (AOAC 989.05).

Para a obtenção do teor em cinzas, fez-se uma incineração a $550 \pm 15^\circ\text{C}$ durante 12 horas (AOAC 935.42).

Para a determinação da humidade presente na amostra, colocou-se uma quantidade conhecida de amostra (1 g) na estufa (105°C) até se obter uma massa constante.

Os hidratos de carbono foram calculados por diferença (**Equação 1**), enquanto que a energia total foi determinada de acordo com a **equação 2**, apresentada abaixo.

$$\text{Hidratos de carbono} = 100 - (g_{\text{proteínas}} + g_{\text{lipídios}} + g_{\text{cinzas}})$$

Equação 1. Equação para determinação de hidratos de carbono

$$\text{Energia (Kcal)} = 4 \times (g_{\text{proteínas}} + g_{\text{hidratos de carbono}}) + (9 \times g_{\text{gordura}})$$

Equação 2. Equação para determinação da energia total

3.4. Avaliação da cor nos frutos de *Rubus ulmifolius*

Para a medição da cor das amostras, foi utilizado um colorímetro (modelo CR-400; Konica Minolta Sensing, Inc., Tóquio, Japão) acoplado a um adaptador para materiais granulosos (modelo CRA50), seguindo a metodologia previamente descrita por Roriz et al. (2017).

O valor das coordenadas tridimensionais CIE L^* a^* b^* , foram obtidos num sistema computadorizado com um iluminante tipo C e um diafragma de diâmetro 8 mm, sendo que para o processamento dos dados, recorreu-se ao software Spectra Magic Nx (versão CM-S100W 2.03.0006, Konica Minolta, Japão). Relativamente às coordenadas tridimensionais obtidas, L^* representa a luminosidade, a^* representa a cromaticidade num eixo do verde (-) a vermelho (+), e b^* representa a cromaticidade num eixo do azul (-) ao amarelo (+), como ilustrado na **Figura 11**.

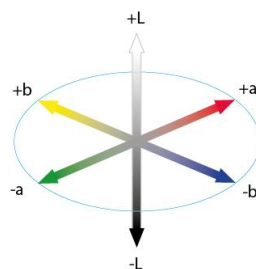


Figura 11. Modelo das coordenadas tridimensionais da cor: CIE L^* a^* b^* .
(Fonte: Sánchez-Mata & Tardío, 2016)

Para a avaliação da cor, retiraram-se 3 porções equitativas da amostra (fruto fresco e fruto liofilizado em pó) a ser analisada, e fizeram-se leituras em 3 pontos distintos para cada porção, considerando-se os valores médios. Previamente e após a análise, o instrumento utilizado foi calibrado com um padrão branco (Spectra Magic NX Instruction Manual, Konica Minolta Sensing, Inc., 2009, Japão).

3.5. Determinação da composição química dos frutos de *Rubus ulmifolius*

3.5.1. Açúcares

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), conforme descrito anteriormente por Barros et al. (2013b).

A amostra (1 g) foi enriquecida com melezitose (utilizada como padrão interno, 25 mg/mL) e extraiu-se com 40 mL de etanol (80/20, v/v), num banho a 80 °C (Julabo, SW22; Seelbach, Alemanha), durante 1 hora e 30 min, com agitação a cada 15 minutos. Posteriormente, o sobrenadante obtido foi centrifugado (centrífuga refrigerada K24OR, Centurion, Sussex Ocidental, Reino Unido) a 15,000 g durante 10 minutos e transferido para um balão de vidro para evaporar a fração etanólica, recorrendo-se ao evaporador rotativo (Büchi R-210, Flawil, Suíça) (60 °C, pressão reduzida). A fase aquosa foi lavada 3 vezes com éter dietílico (10 mL), tendo sido, seguidamente, os restos do mesmo evaporados. Ao resíduo seco obtido, foi adicionada água até perfazer um volume final de 5 mL e filtrou-se 1,5 mL do mesmo (filtros de nylon - 0,2 µm, Whatman) para um vial, para posterior análise do perfil em açúcares no sistema HPLC.

O sistema de HPLC encontra-se equipado com uma bomba (Knauer, Sistema Smartline 1000, Berlim, Alemanha), um sistema desgaseificador (Smartline manager 5000), um amostrador automático (AS-2057 Jasco, Easton, Maryland, EUA) e um detetor de índice de refração (Knauer Smartline 2300). A separação cromatográfica foi obtida através de uma coluna Eurospher 100-5 NH₂ (4,6 x 250 mm, 5 µm, Knauer), que operou a uma temperatura de 35 °C (7971 R Grace).

Como fase móvel foi usado acetonitrilo/água desionizada (70:30; v/v) com um caudal de 1 mL/min, sendo o volume de injeção de 10 µL. Para a identificação dos compostos, recorreu-se ao software Clarity 2,4 Software (DataApex), com o qual se compararam os tempos de retenção relativos dos picos da amostra, com padrões conhecidos. Os

resultados foram obtidos pelo método do padrão interno e expressos em grama de composto por 100 g de massa fresca.

3.5.2. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos foram determinados através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de díodos (UFLC-DAD), de acordo com um procedimento previamente descrito por Barros et al. (2013a).

A extração foi realizada ao abrigo da luz adicionando 25 mL de ácido metafosfórico (4,5%) à amostra (1,5 g), mantendo as condições de temperatura de 25 °C e agitação constante (150 *rpm*) durante 45 minutos. Após extração, a mistura foi filtrada através de papel de filtro (Whatman N ° 4) e, posteriormente, através de filtros de nylon (0,2 µm; Whatman) para análise em UFLC (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). A separação dos mesmos foi obtida através de uma coluna SphereClone (Phenomenex, Torrance, California, EUA) de fase inversa C₁₈ (5 µm, 250 mm × 4,6 mm i.d.) termostaticada a 35 °C, sendo a eluição realizada com ácido sulfúrico (3,6 mM) com um caudal de 0,8 mL/min, sendo o volume de injeção de 20 µL.

A deteção dos ácidos orgânicos foi conseguida recorrendo a um sistema DAD, aplicando os comprimentos de onda de 215 nm e 245 nm (para o ácido ascórbico). A quantificação dos compostos foi efetuada por comparação da área dos seus picos registados, nos comprimentos de onda referidos anteriormente, com as curvas de calibração obtidas a partir dos padrões do respetivo composto. Os resultados foram expressos em mg de composto por 100 g de massa fresca.

3.5.3. Ácidos gordos

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama (GC-FID), como descrito anteriormente por Pereira et al. (2012).

Ao extrato lipídico obtido previamente por extração em Soxhlet, foram adicionados 5 mL de uma solução de metanol/ácido sulfúrico/tolueno, na proporção 2:1:1 (*v/v/v*) e a mistura permaneceu num banho (Julabo, SW22; Seelbach, Alemanha) a 50 °C (com agitação de 160 *rpm*) durante aproximadamente 12 h. Após retirar os tubos do banho e, com o intuito de potenciar a separação de fases, foi adicionada água desionizada (3 mL) na mistura e, posteriormente, para recuperação dos esteres metílicos de ácidos gordos (FAME)

adicionou-se éter dietílico (3 mL), ambos os passos com agitação em *vórtex*. Após separação das fases, transferiu-se o sobrenadante para um vial, no qual se adicionou previamente sulfato de sódio anidro, a fim de desidratar o sobrenadante. Por último, filtrou-se o mesmo através de filtros de nylon (0,2 µm; Whatman; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para um vial, para posterior análise em GC.

O perfil de ácidos gordos foi obtido através de um sistema de GC (Modelo DANI GC 1000) equipado com um injetor *split/splitless*, um detetor de ionização de chama (FID, 260 °C) e uma coluna Zebron-Kame (30 m × 0,25 mm ID × 0,20 µm d_f; Phenomenex, Lisboa, Portugal). O programa de temperatura aplicado foi o seguinte: temperatura inicial de 100 °C, durante 2 min; aumento progressivo da temperatura: 10 °C/min até 140 °C; 3 °C/min até 190 °C; 30 °C/min até 260 °C que permaneceu durante 2 min. O gás de transporte utilizado foi o hidrogénio com um caudal de 1,1 mL/min, medido a 100 °C. A injeção *split* (1:50) foi realizada a 250 °C, onde foi injetado 1 µL da amostra.

A identificação de ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos de FAME das amostras com padrões conhecidos. Para o processamento dos resultados, recorreu-se ao software CSW 1,7 (DataApex 1,7, Praga, República Checa) e estes foram expressos em percentagem relativa (%) para cada ácido gordo detetado.

3.5.4. Tocoferóis

Os tocoferóis foram analisados através de um sistema HPLC acoplado a um detetor de fluorescência (HPLC-FL), segundo um procedimento descrito por Barros et al. (2013b). Para realizar o processo de extração, à amostra de frutos (500 mg) foi adicionada uma solução de BHT em hexano (10 mg/mL; 100 µL) e uma solução de tocol (usado como padrão interno - PI) em hexano (50 µg/mL; 400 µL). A amostra foi, de seguida, homogeneizada com 4 mL de metanol (*vórtex*, 1 minuto) e ainda, com 4 mL de hexano (*vórtex*, 1 minuto). Após homogeneização da amostra, adicionou-se uma solução aquosa concentrada de NaCl (2 mL), homogeneizando-se (*vórtex*, 1 min) e centrifugando-se (5 min; 4000g; 10°C). O sobrenadante obtido foi transferido para um vial e re-extraído o mesmo duas vezes com hexano. Posteriormente, ao extrato obtido, adicionou-se sulfato de sódio anidro, a fim de desidratar o sobrenadante, que foi levado à secura sob corrente de azoto. Por fim, redissolveu-se o extrato obtido em n-hexano (2 mL) e filtrou-se através de um filtro nylon (0,2 µm; Whatman) para um vial âmbar para posterior análise.

O sistema HPLC (descrito previamente na secção 3.5.1.) utilizado para a análise dos compostos, encontrava-se acoplado a um detetor de fluorescência (FP-2020; Jasco), programado para excitação (λ_{ex}) a 290 nm e emissão (λ_{em}) a 330 nm. A separação cromatográfica foi obtida com uma coluna de fase normal Poliamida II (250 mm \times 4,6 mm i.d., 5 μ m, YMC Waters, Milford, EUA) com uma temperatura de 35 °C. Como fase móvel, usou-se uma mistura de n-hexano e acetato de etilo (70:30, v/v) com um caudal de 1 mL/min, sendo o volume de injeção de 10 μ L.

A identificação dos compostos foi realizada através de comparações cromatográficas de compostos padrão. A quantificação foi obtida pelo método do padrão interno, com base em curvas de calibração de compostos padrão. A análise de dados foi executada com o software Clarity 2,4 (DataApex) e os resultados foram expressos em mg de composto por 100 g de massa fresca.

3.5.5. Compostos fenólicos

Para análise dos compostos fenólicos (antociânicos e não antociânicos) seguiu-se uma metodologia previamente descrita pelos autores Bessada et al. (2016) e Gonçalves et al. (2017).

3.5.5.1. Compostos fenólicos não antociânicos

Procedimento de extração. Foi preparado um extrato a partir do material vegetal seco. A amostra liofilizada (frutos de *R. ulmifolius*) (1 g) foi submetida a maceração com uma solução de etanol/água (80:20, v/v; 30 mL) à temperatura ambiente, com agitação constante (150 rpm) durante 1 hora. Posteriormente, foi filtrada através de um papel de filtro (Whatman No. 4; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e o processo foi repetido, sendo a amostra re-extraída com 30 mL da mesma solução hidroetanólica. Por fim, a fração alcoólica dos extratos obtidos foi evaporada a pressão reduzida (Büchi R-210, Flawil, Suíça) e liofilizados (47 °C, 0.045 bar; FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EUA) para posteriores análises.

Purificação da amostra. Para a purificação da amostra, 10 mL do extrato (50 mg/mL) passou através de uma coluna C₁₈ SepPak[®] (Vac 3 cm³; Phenomenex, Califórnia, EUA), previamente ativada com 5 mL de metanol e, posteriormente com 5 mL de água (**Figura 12**). Os açúcares e as substâncias mais polares foram removidas com 15 mL de água e os

compostos fenólicos foram eluídos com metanol (15 mL). Os extratos metanólicos foram concentrados, re-dissolvidos numa solução de MeOH/H₂O (20:80, v/v, 1 mL) e seguidamente, filtrados através de discos LC descartáveis de 0,22- μ m para posterior análise em HPLC (Rodrigues et al., 2012).

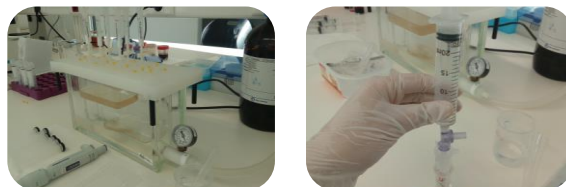


Figura 12 Processo de purificação dos compostos fenólicos não antociânicos.

Método analítico. Para a análise cromatográfica foi utilizado um sistema Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) equipado com uma bomba quaternária, um injetor automático (a 5 °C), um degasificador e um compartimento de coluna com termóstato automatizado. A deteção dos compostos foi efetuada com detetor de díodos (DAD), usando os comprimentos de onda de 280 nm, 330 nm e 370 nm e acoplado a um detetor de espectrometria de massa (MS).

Para a separação dos compostos, utilizou-se uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 de fase reversa C₁₈ (4,6 x 150 mm, 3 μ m; Milford, EUA) termostaticada a 35 °C. A fase móvel utilizada foi (A) ácido fórmico/água (0,1%) e (B) acetonitrilo. O gradiente de eluição estabelecido foi isocrático: 10% a 15% B até 5 min, 15-20% B até 5 min, 20-25% B 10 min, 25-35% B 10 min, 35-50% B 10 min e reequilíbrio da coluna por 10 min; sendo definida uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. O sistema de HPLC descrito encontrava-se também interligado a um espectrómetro de massa (MS).

A deteção de MS foi feita utilizando uma espectrómetro de massa Ion Trap Linear LTQ XL (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA), equipada com uma fonte ESI (fonte de ionização electrospray). O gás de arraste utilizado foi azoto (50 psi); o sistema trabalhou com uma voltagem de spray de 5 kV, a uma temperatura inicial de 325 °C e tensão capilar de -20 V. A voltagem do *tube lens offset* foi mantida a -66 V. Os espetros foram gravados em modo de ião negativo entre 100 e 1500 *m/z*. A energia de colisão utilizada foi de 35 (unidades arbitrárias). Os dados foram recolhidos e analisados utilizando o programa Xcalibur® (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA).

Para a identificação dos compostos procedeu-se à comparação dos dados obtidos (tempos de retenção, espectros UV-Vis e espectros de massa) com dados disponíveis na literatura e, quando disponíveis, com os padrões. Para análise quantitativa, obtiveram-se as curvas de calibração por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas (2,5-100 µg/mL): ácido cafeico ($y = 388345x + 406369$), ácido clorogénico ($y = 168823x - 161172$), taxifolina ($y = 203766x - 208383$), quercetina-3-*O*-glucósido ($y = 34843x - 160173$), ácido elágico ($y = 26719x - 317255$), baseadas nos sinais UV-Vis e utilizando o comprimento de onda máximo de absorção de cada composto padrão. Nos casos em que não se verificou disponibilidade de padrões para os respetivos compostos, a quantificação foi feita através de curvas de calibração de compostos do mesmo grupo fenólico. Os resultados foram expressos em mg de composto por g de extrato.

3.5.5.2. Compostos fenólicos antociânicos

Procedimento de extração. As amostras liofilizadas dos frutos (1 g) foram sujeitas a uma maceração, realizada à temperatura ambiente, com agitação magnética, durante 1h, com uma solução de EtOH/H₂O (80/20, v/v, 30 mL) acidificada com TFA (0,5%). De seguida, foram filtradas através de papel de filtro (Whatman n°4), e o restante resíduo re-extraído com a solução de extração descrita anteriormente. Com o objetivo de eliminar o etanol, o filtrado foi evaporado a 35 °C (evaporador rotativo, Büchi R-210, Flawil, Suíça) e a fração aquosa liofilizada (-47 °C, 0.045 bar; FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EUA). O extrato obtido foi, posteriormente, re-dissolvido numa solução de MeOH/H₂O (20:80, v/v, 1 mL) e seguidamente, filtrados através de discos LC descartáveis de 0,22-µm para posterior análise em HPLC.

Método analítico. As antocianinas foram analisadas usando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Dionex UltiMate 3000 UPLC, Thermo Scientific) descrita na seção 3.5.5.1.. Para a separação dos compostos e recorreu-se a uma coluna de fase reversa AQUA[®] C₁₈ (5 µm, 150 mm × 4,6 mm i.d., Phenomenex) termostaticada a 35 °C. Os solventes usados foram: (A) 0,1% TFA em água e (B) 100% acetonitrilo. O gradiente aplicado foi: 10% B até 3 min, 10 a 15% B 12 min, 15% B 5 min, 15 a 18% B 5 min, 18 a 30% B 20 min e 30 a 35% 5 min, a uma taxa de fluxo de 0.5 mL/min. Os solventes utilizados foram 0,1% ácido trifluoroacético (ATF) em água (A) e acetonitrilo (B). A eluição em modo gradiente seguiu os seguintes parâmetros: 10% B por 3 min, de 10 a 15% B por 12 min, 15% B por 5 min, de 15 a 18% B por 10 min, de 18 a 30% B por

20 min, de 30 a 35% B por 5 min e 35 a 10% B por 10 min. O tempo total de análise foi de 60 minutos, seguido do acondicionamento da coluna durante 10 min, a um caudal de 0,5 mL/min. A deteção foi realizada com um detetor DAD, utilizando como o comprimento de onda principal 520 nm, e com espectroscopia de massa ligada em série através da saída da célula DAD.

A deteção SM foi realizada em modo positivo utilizando um espectrómetro de massa Linear Ion Trap LTQ XL (Thermo Finnigan) equipado com uma fonte ESI. O azoto foi utilizado como gás de revestimento (50 psi); e o sistema foi operado com uma tensão de pulverização de 4,8 kV, uma temperatura da fonte de 320°C e uma tensão capilar de 14 V. O deslocamento da lente do tubo foi mantido a uma tensão de 75 V. O varrimento abrangeu uma amplitude de massa de m/z 100 a 1500. A energia de colisão utilizada foi de 20 (unidades arbitrárias). A aquisição de dados foi realizada com o sistema de dados Xcalibur® (Thermo Finnigan).

A caracterização das antocianinas presentes nas amostras foi obtida recorrendo ao seu espectro UV-Vis e de massa, sendo os seus tempos de retenção comparados com padrões, quando disponíveis. Para análise quantitativa, obtiveram-se as curvas de calibração por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas (0,25-50 µg/mL): cianidina-3-*O*-glucósido ($y = 104478x - 823429$; $R^2 = 0,993$) e pelargonidina-3-*O*-glucósido ($y = 50652x - 696848$; $R^2 = 0,969$). Os resultados foram expressos em mg por g de extrato.

3.6. Avaliação das propriedades bioativas dos frutos de *Rubus ulmifolius*

3.6.1. Análise da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do extrato foi avaliada recorrendo ao método colorimétrico de microdiluição usando o corante cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT), de acordo com o procedimento descrito por Pires et al. (2018).

Os microrganismos utilizados foram isolados clínicos obtidos de pacientes hospitalizados em diferentes departamentos no Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro Vila Real, Norte de Portugal. Para a realização do ensaio, foram utilizadas 5 estirpes de bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*), 4 estirpes de bactérias Gram-positivas (MRSA- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MSSA- methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecalis*) e um fungo (*Candida albicans*).

Para a realização do ensaio, inicialmente redissolveu-se o extrato preparado previamente na secção 3.5.5.1 numa solução com 5% de DMSO e 95% de meio de cultura), obtendo-se uma solução mãe com uma concentração de 100 mg/mL. A cada um dos 96 poços da microplaca, adicionaram-se 150 µL de meio de cultura MHB (Muller Hinton Broth) a 40 µL de solução inicial (solução mãe). A partir desta, fizeram-se diluições sucessivas, obtendo-se concentrações de 20 mg/mL a 0,156 mg/mL.

Relativamente a cada estirpe de bactéria, estas prepararam-se recorrendo à leitura da densidade ótica (espectrofotómetro SHIMADZU UV-120-01) e posterior ajuste para 0,50 nm, pela escala de McFarland, correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. De seguida, adicionou-se 10 µL dos mesmos inóculos bacterianos a cada poço e as placas foram incubadas na estufa (Jouan, Berlim, Alemanha) a uma temperatura de 37 °C, durante 24 horas.

Os resultados foram expressos em valores de CMI (concentração mínima inibitória), definida como sendo a menor concentração de extrato para inibir o crescimento microbiano; também CMB (concentração mínima bactericida) e CMF (concentração mínima fungicida), definida como sendo a menor concentração de extrato necessária para matar um microrganismo. Ambos os valores são expressos em mg/mL.

Também a presença ou ausência de turbidez do meio, denuncia a proliferação celular ou ausência desta, respetivamente. Neste sentido, foi adicionado o composto INT (0,2 mg/mL; 40 µL) a cada poço da microplaca, incubando-se a 37 °C por 30 minutos. Este ensaio (**Figura 13**) permite analisar a viabilidade celular e, conseqüentemente, a potencialidade antimicrobiana do extrato: caso houvesse alteração da coloração da solução de incolor para cor de rosa, significava que as bactérias se encontravam viáveis e o extrato não foi eficaz contra esta; contrariamente, se a solução se mantivesse incolor, o extrato foi eficaz e inibiu a proliferação celular.

Além das preparações para avaliação da atividade, foram ainda preparados 2 controlos, 1 negativo e outro positivo. Como controlo positivo (ausência de atividade por parte das bactérias) utilizaram-se antibióticos, sendo que, para bactérias Gram-negativos recorreu-se à ampicilina (20 mg/mL) e ao imipenem (1 mg/mL), enquanto que, para bactérias Gram-positivos utilizou-se vancomicina (1 mg/mL) e ampicilina (20 mg/mL); já como controlo negativo (presença de atividade por parte das bactérias) utilizou-se uma solução de meio juntamente com inóculo de bactéria.

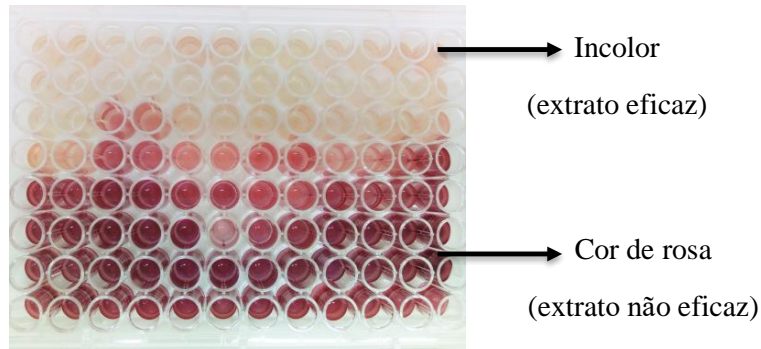


Figura 13. Exemplo representativo da leitura de resultados do teste de INT.

3.6.2. Avaliação da citotoxicidade em linhas celulares tumorais

Para a avaliação da atividade citotóxica em células tumorais foi usado o extrato hidroetanólico obtido na secção 3.5.5.1, que posteriormente foi dissolvido em água até obter uma concentração de 8 mg/mL. Neste ensaio foi aplicado o método da sulforodamina B (SRB), descrito por Abreu et al. (2011), a fim de determinar o nível de inibição do crescimento celular. Para tal, foram utilizadas 4 linhas celulares tumorais: MCF-7 (carcinoma da mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular), obtidas no DSMZ – Leibniz – Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.

Todos os procedimentos foram realizados em ambiente asséptico e em câmara de fluxo laminar (TLStar, AV-30/70), a fim de evitar contaminações. Foram testadas concentrações de 0,125 a 8 mg/mL, através da diluição em água.

As células foram mantidas em meio RPMI-1640 contendo 10% de Soro Fetal de Bovino (SFB) inativado pelo calor (MCF-7 e NCI-H460) ou em DMEM suplementado com 10% SFB, 2 mM glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (células HeLa e HepG2), numa incubadora com condições estabelecidas de 37 °C, ar humidificado e 5% CO₂ (HF 151, Heal Force).

Em primeiro lugar, retirou-se o meio de cultura de cada caixa que continha as linhas celulares e adicionou-se o meio de lavagem (HBSS, 2 mL). Seguidamente, adicionou-se a enzima proteolítica tripsina (1,5 mL) e colocou-se na incubadora durante 3 minutos, com o intuito das células descolarem. Após 3 minutos, adicionou-se meio de cultura (3 mL) para inativar a tripsina evitando, desta forma, a destruição celular. A suspensão celular obtida foi pipetada e transferida para um falcon estéril para centrifugar a 1200 rpm, 5 min, T=10 °C (Centurion K24OR, West Sussex, Reino Unido).

Seguidamente, rejeitou-se o sobrenadante e suspendeu-se o pellet em 5 mL de meio de cultura. Desta, retiraram-se 50 μ L de suspensão, à qual se adicionou 50 μ L de solução de azul tripano, homogeneizando de seguida, para a contagem do número de células numa câmara de Neubauer. Neste seguimento, cada linha celular foi plaqueada numa densidade apropriada ($1,0 \times 10^4$ células/poço), de acordo com os cálculos efetuados, em placas de 96 poços. Obtiveram-se 5 diluições distintas da amostra (10 μ L) 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 sulforodamina B (SRB). Após tal período de incubação, adicionou-se a cada poço ácido tricloroacético frio (TCA, 10%; 100 μ L), incubando-se de seguida durante 60 min a 4 °C. As microplacas foram lavadas com água desionizada e secas. De seguida, adicionou-se solução de SRB (0,1% em 1% ácido acético; 100 μ L), ficando a placa a incubar durante 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, lavou-se a placa com ácido acético (1%) para remover o excesso de SRB e deixou-se secar ao ar. A SRB foi solubilizada com 200 μ L de Tris (10 mM; pH 7,4) num agitador de microplacas (Stat Fax-2100). A absorvância foi medida a 540 nm num leitor de microplacas (Instrumentos Bio-Tek, ELX800, Inc; Winooski, EUA), utilizando-se a elipticina como controlo positivo. Os resultados foram expressos em valores de GI_{50} (concentração de amostra que inibe 50% de crescimento celular) em unidades de μ g/mL.

3.6.3. Avaliação da hepatotoxicidade em células não tumorais

Neste teste foi utilizado fígado de porco, obtido num matadouro local, de forma a obter uma cultura celular não tumoral designada por PLP2 (cultura primária de células de fígado de porco). O tecido de fígado foi lavado com solução Hank's contendo 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomina e dividido em explantes de aproximadamente 1 mm³. Alguns destes explantes foram colocados em frascos de 25 cm² contendo meio DMEM suplementado com FBS (10%), aminoácidos não essenciais (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomina (100 μ g/mL). Os frascos foram incubados a 37 °C com atmosfera humidificada e 5% de CO₂. O meio foi substituído a cada dois dias de incubação e o crescimento celular foi monitorizado por observação com um microscópio de contraste de fase.

Foram transferidos para microplacas de 96 poços 190 μ L da cultura celular com densidade adequada ($1,0 \times 10^4$ células/poço), juntamente com 10 μ L das diferentes

diluições do extrato, mencionado na secção 3.5.5.1. (400 a 1,5 µg/mL), incubando-se a 37°C por 48 horas. Em seguida, efetuou-se o ensaio SRB anteriormente descrito (secção 3.6.2.; **Figura 14**). A elipticina foi utilizada como controlo positivo e os resultados foram expressos em GI₅₀ (concentração de amostra que inibe 50% de crescimento celular em cultura de células PLP2) em unidades de µg/mL.

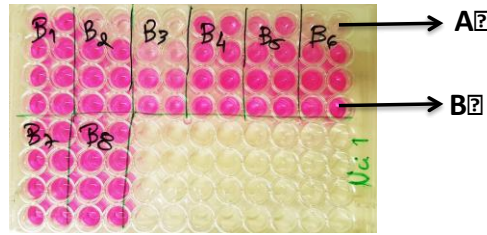


Figura 14. Exemplo representativo dos resultados obtidos num ensaio SRB; A – resultado da inibição do crescimento de células tumorais; B – resultado do crescimento de células tumorais.

3.7. Otimização do processo de extração para obtenção de um corante natural à base de antocianinas, a partir dos frutos de *Rubus ulmifolius*

O processo industrial de obtenção de extratos naturais com potencial corante é utilizado desde há muitos anos e consiste, principalmente, numa maceração com recurso a misturas de solventes com água, seguido de outras etapas. No entanto, este processo convencional, que tem sido usado em grande escala, apresenta algumas desvantagens, tais como altos gastos de energia e longos tempos de extração (Wang et al., 2013; Wang et al., 2016; Zhu et al., 2016). Deste modo, de forma a simplificar e reduzir os custos operacionais do processo de extração destes compostos, é conveniente desenvolver um desenho experimental, por exemplo, recorrendo à metodologia superfície resposta (MSR), com o intuito de diminuir os tempos do processo de extração, diminuir a energia despendida e, também, reduzir o consumo de solvente (Zhu et al., 2016; Roriz et al., 2017).

No entanto, para a obtenção de um extrato rico em antocianinas, é essencial considerar vários fatores que afetam a sua estabilidade, entre os quais, pH, temperatura, luminosidade, níveis de oxigênio presentes, e solventes utilizados na extração (Rodríguez-Amaya, 2016), além dos inúmeros factores que geram discrepâncias entre matrizes naturais (Montesano et al., 2008). Neste contexto, para se alcançar uma máxima eficiência de extração, é imprescindível proceder a uma avaliação das condições ótimas para cada variável envolvida (Jiménez et al., 2018).

Com recurso à metodologia MSR é possível otimizar estes fatores de forma simultânea, obtendo-se modelos polinomiais que permitem descrever as condições ideais que maximizam os critérios de resposta (Roriz et al., 2017).

3.7.1. Extração assistida por calor (HAE)

A HAE, tradicionalmente conhecida por maceração, é uma extração sólido/líquido que consiste em adicionar à amostra um solvente, a uma determinada temperatura e agitação contínua (Wang et al., 2016), sendo considerado um método conveniente à escala industrial, uma vez que consiste numa técnica simples que requer um número reduzido de equipamentos (Roriz et al., 2017; Backes et al., 2018; López et al., 2018).

Esta extração foi realizada num banho-maria com termostato (Julabo, SW22; Seelbach, Alemanha) e, com agitação magnética contínua, para a qual se utilizou um agitador magnético Cimarec™, fixando a velocidade de 500 rpm (Thermo Scientific, San José, CA, EUA). Com a finalidade de minimizar a evaporação do solvente, a reação foi realizada num frasco de vidro fechado.

Para efetuar a HAE (**Figura 15**), a amostra de frutos de *R. ulmifolius* (1 g) foi colocada no frasco, juntamente com 20 mL de solvente (etanol, água ou misturas de etanol/água, sempre acidificados com 0,25% de ácido cítrico até obtenção de pH = 3), seguindo as condições de extração predefinidas pelo modelo MSR (**Tabela 5**): tempo (t ou X_1 , 20 a 120 min), temperatura (T ou X_2 , 20 a 90°C) e percentagem de etanol (S ou X_3 , 0 a 100%). A relação sólido-líquido (S/L ou X_4) foi mantida a 50 g/L.



Figura 15. Procedimento de extração de antocianinas

3.7.2. Preparação dos extratos obtidos pelo HAE

Após o procedimento de cada extração, as amostras foram centrifugadas (6000 rpm; durante 20 min a 10 °C) e para remoção dos sólidos em suspensão, foram filtradas através de papel de filtro (Whatman nº 4). O sobrenadante foi colhido e dividido em duas frações:

uma para análise em HPLC-DAD e a segunda para determinação do rendimento da extração. A fração separada para análise em HPLC (2 mL) foi filtrada através de filtro de seringa LC (0,22 µm) e, de seguida injetada; a segunda fração, utilizada para determinação do rendimento de extração (5 mL) foi submetida a secagem com uma temperatura de 105 °C durante 48 horas, para posterior pesagem dos sólidos.

3.7.3. *Quantificação dos compostos antociânicos por HPLC-DAD*

Os extratos obtidos no processo de HAE foram analisados utilizando um sistema Dionex Ultimate 3000 HPLC (Thermo Scientific) tal como descrito na seção 3.5.5.1.

As antocianinas presentes nas amostras foram caracterizadas de acordo com os seus espectros UV-Vis e massa e tempos de retenção em comparação com a identificação obtida na seção 4.3.. A análise quantitativa compostos antociânicos foi obtida através de curva de calibração com a injeção de padrões de concentrações conhecidas (200–0,25 µg/mL) dos compostos: cianidina-3-*O*-glucósido ($y = 104478 x - 823429$; $R^2 = 0,993$) e pelargonidina-3-*O*-glucósido ($y = 50652 x - 696848$; $R^2 = 0,9686$).

3.7.4. *Formato de resposta utilizada para processos analíticos*

O rendimento (%) e o teor em antocianinas (A) foram utilizados como respostas. Cinco compostos antociânicos foram detetados (**Figura 16**), entre os quais: cianidina-*O*-di-hexósido (A1), cianidina-3-*O*-glucósido (A2), pelargonidina-3-*O*-glucósido (A3), cianidina-3-*O*-xilósido (A4) e cianidina-3-*O*-dioxail-glucósido (A5). No entanto, apenas quatro das antocianinas referidas foram detetadas em teor suficiente para serem incluídos na análise MSR. Deste modo, como respostas foram incluídos os seus teores individuais (A2 a A5) e a sua respetiva soma (AT). Os resultados foram expressos em mg de antocianinas (A) por material extraído (mg A/g E), o qual foi especificamente utilizado para avaliar a pureza de A nos extratos.

***Rubus ulmifolius* Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos**

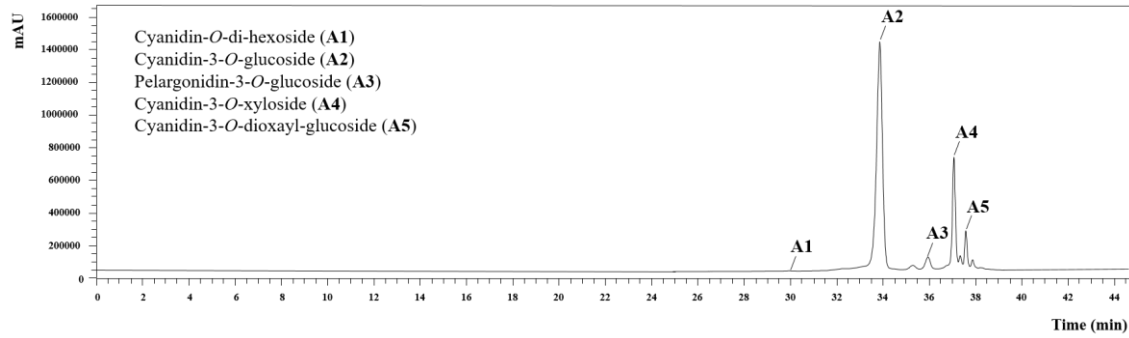


Figura 16. Cromatograma obtido para identificação dos compostos antociânicos

3.7.5. Desenho experimental, modelo de análise e avaliação estatística

3.7.5.1. Desenho experimental MSR

Foram realizados ensaios baseados na análise individual das variáveis e aquelas que causaram efeitos significativos juntamente com os intervalos relevantes, foram selecionadas (**Tabela 5**). Os efeitos das três variáveis definidas foram estudados utilizando um *desenho composto central circunscrito (DCCC)*, associado a cinco níveis (Heleno et al., 2016), o qual gerou 28 combinações de respostas, realizadas com o intuito de obter uma maior capacidade preditiva do modelo.

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

VALORES CODIFICADOS	VALORES NATURAIS		
	$X_1: t \text{ (min)}$	$X_2: T \text{ (}^\circ\text{C)}$	$X_3: S \text{ (\%)}$
-1.68	20	20	0
-1	40,3	37,2	20,3
0	70	55	50
+1	99,7	72,8	79,7
+1.68	120	90	100

3.7.5.2. Modelo matemático

Os dados de MSR foram ajustados através do cálculo dos mínimos quadrados, usando a equação polinomial de segunda ordem com termos de interação complexos:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{\substack{j=2 \\ j>i}}^n b_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^n b_{iij} X_i^2 X_j^2$$

Equação 3. Equação polinomial de segunda ordem usada no modelo matemático

Para a qual:

Y - variável dependente (variável de resposta) a ser modelada,

X_i e X_j - variáveis independentes,

b_0 - coeficiente constante,

b_i - coeficiente que descreve o efeito linear individual de cada variável,

b_{ij} - coeficiente responsável por descrever os mecanismos interativos lineares entre 2 variáveis,

b_{ii} - coeficiente responsável pelo efeito quadrático de cada variável,

b_{iij} - coeficiente responsável pela descrição dos mecanismos interativos quadráticos entre 2 variáveis ,

n - número total de variáveis.

Como respostas (Y) foram aplicados o rendimento de extração (*Rendimento*, %), o teor individual (mg A/g E) de cada antocianina detetada em maior concentração (A2 a A5) e a sua respetiva soma (AT).

3.7.5.3. Procedimento para otimização das variáveis

Com o objetivo de otimizar o modelo de previsão e, conseqüentemente, maximizar o rendimento da extração, recorreu-se a um método *simplex*, o qual permite resolver problemas não lineares (Vieira et al., 2017). Para evitar variáveis com condições físicas não naturais e irrealistas, foram impostas algumas limitações às variáveis codificadas (nomeadamente $t \geq 0$).

3.7.5.4. Análise dose-resposta da relação Sólido-Líquido (S/L)

O padrão da razão sólido-líquido é um importante parâmetro a determinar, no sentido de se alcançar um processo mais produtivo e mais sustentável. Deste modo, após a otimização das condições experimentais, previamente definidas como X_1 , X_2 e X_3 , procede-se ao estudo da razão sólido-líquido S/L (ou X_4 ; expressa em g/L). Para a representação do efeito resposta, em função da relação sólido-líquido, usou-se uma equação linear com ordenada na origem, uma vez que, os pontos seguem uma distribuição linear à medida que o S/L aumenta. O valor paramétrico do declive (m) permitiu avaliar o efeito dose-resposta. Assim, valores positivos indicam um aumento nas respostas de

extração, enquanto que, valores negativos indicam uma diminuição na eficiência de extração, ambos resultantes de um aumento de S/L .

3.7.5.5. Métodos numéricos, análise estatística e ilustrações gráficas

Os procedimentos de ajuste, as estimativas de coeficientes e os cálculos estatísticos dos resultados experimentais foram realizados de acordo com um procedimento anteriormente descrito por Prieto & Vázquez (2014). De uma forma breve:

- a) para a determinação dos coeficientes, recorreu-se ao algoritmo não linear quasi-Newton (mínimos quadrados), através da macro 'Solver' introduzida no Microsoft Excel (2013), para minimizar as diferenças entre os valores obtidos e os valores previstos pelo modelo;
- b) a significância dos coeficientes foi avaliada através da macro 'SolverAid', com o intuito de determinar os seus intervalos ($\alpha = 0,05$);
- c) a consistência do modelo foi comprovada através de vários critérios estatísticos aplicados: i) o F -teste de Fisher ($\alpha = 0,05$) foi utilizado para avaliar o ajuste do modelo aos dados observados; ii) a macro 'SolverStat' foi aplicada para determinar as incertezas na previsão dos parâmetros e modelos (Murado & Prieto, 2013); iii) o R^2 foi interpretado como a proporção de dados explicados pelo modelo.

3.8. Preparação do extrato rico em antocianinas a partir do fruto de *Rubus ulmifolius*

Após a otimização do processo de extração para a obtenção de um extrato rico em antocianinas, realizou-se uma HAE com os frutos de *R. ulmifolius*, do qual resultou um extrato corante rico em cianidina- O -di-hexósido, cianidina-3- O -glucósido, cianidina-3- O -xilósido, cianidina-3- O -dioxyl-glucósido e pelargonidina-3- O -glucósido.

A amostra foi colocada juntamente com solvente etanol/água (46:54, v/v) acidificado com 0.25% de ácido cítrico (até obtenção de $\text{pH} = 3$), num frasco de vidro com tampa, na proporção de 25 g/L. A extração seguiu condições estabelecidas de temperatura (57 °C) e tempo (20 minutos). Após o procedimento descrito, as amostras foram centrifugadas (Centurion K24OR, West Sussex, Reino Unido) a 5000 rpm, durante 5 min a 10 °C e filtradas através de papel filtro (Whatman nº 4). O sobrenadante foi evaporado num evaporador rotativo a 35 °C (Büchi R-210, Flawil, Suíça) de forma a remover a fração

etanólica. Por fim, a fração aquosa obtida foi liofilizada (FreeZone 4.5, Labconco) obtendo-se um extrato rico em compostos antocianínicos.

3.8.1. Avaliação do potencial corante do extrato rico em antocianinas do fruto de Rubus ulmifolius

A avaliação do potencial corante do extrato foi efetuado através da medição da cor e pela medição dos compostos corante por cromatográfica, de forma a corroborar os dados fornecidos pelo MSR. Assim, a leitura dos parâmetros da cor foi realizada em três pontos distintos, com recurso a um colorímetro (Konica Minolta Sensing Inc; Chroma meter modelo CR-400, Tokio, Japão), tal como descrito, anteriormente, na secção 3.3.. A análise cromatográfica foi realizada através de um sistema de HPLC-DAD-ESI/MS tal como descrito na secção 3.5.5.2.

3.8.2. Avaliação das propriedades bioativas do extrato rico em antocianinas do fruto de Rubus ulmifolius

3.8.2.1. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do extrato ótimo rico em antocianinas foi avaliada recorrendo ao método colorimétrico por microdiluição, usando o corante INT, de acordo com o procedimento e estirpes previamente descritas na secção 3.6.1.. Os resultados de CMI e CMB/CMF foram expressos em mg/mL.

3.8.2.2. Atividade citotóxica em linhas celulares tumorais e não tumorais

O extrato ótimo rico em antocianinas foi avaliado ao nível do seu potencial citotóxico, aplicando o método da Sulforodamina B, tal como descrito, anteriormente, na secção 3.6.2. e 3.6.3.. Os resultados foram expressos em valores de GI₅₀, µg/mL.

3.9. Incorporação do extrato rico em antocianinas do fruto de Rubus ulmifolius num produto de pastelaria – “donuts”

3.9.1. Preparação do produto de pastelaria – “donuts”

Para a realização da incorporação do pigmento natural à base de antocianinas, foi preparado um produto de pastelaria idêntico ao donut. Para a preparação dos mesmos foi seguida a seguinte receita: numa taça foram colocados os ingredientes secos, farinha (160

g), açúcar (90 g), fermento em pó (3,5 g) e, sequencialmente, foi adicionado leite (175 mL) e óleo (15 mL) (**Figura 17**), com agitação constante utilizando uma batedeira elétrica (Bosch, Munich, Alemanha) a 450 W durante 8 minutos, até a mistura ficar cremosa e homogénea.



Figura 17. Ingredientes utilizados para elaboração dos “donut”: óleo, farinha, leite, açúcar, fermento, limão e corante à base de antocianinas.

A massa obtida foi dividida em 2 partes: 1 para controlo (sem adição de extrato) e outra para incorporação do corante. Neste sentido, na segunda porção, foi adicionado lentamente o extrato corante (obtido na secção 3.8.) (4 g; previamente dissolvido em 15 mL de sumo de limão) e misturados com a batedeira até se obter uma cor homogénea (tom rosa/roxo). O sumo de limão foi utilizado com o intuito de diminuir o pH da mistura e consequentemente, aumentar a estabilidade do corante antociânico. O pH foi medido em ambas as preparações previamente à cozedura, com recurso a um aparelho medidor de pH (Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, EUA).

Para o cozimento da massa, utilizou-se uma máquina específica para “donuts” (Eletronia, model DF-303) que foi previamente aquecida e barrada com óleo. A mistura foi mantida na máquina por um tempo aproximado de 3 minutos e colocados a arrefecer. O método de confeção dos “donuts” foi selecionado de forma a manter a integridade das antocianinas, já que estas são moléculas muito suscetíveis a degradação, principalmente, devido a alterações de temperatura e pH.

Posteriormente, os “donuts” foram divididos em 4 lotes distintos (8 “donuts” por lote; 4 para cada tempo de armazenamento (t=0 dias e t=3 dias): i) **AM_T0** – “donut” com extrato antociânico (t=0 dias); ii) **AM_T3** – “donut” com extrato antociânico (t=3 dias); iii) **Controlo_T0** – “donut” controlo sem extrato antociânico (t=0 dias); iv) **Controlo_T3** – “donut” controlo sem extrato antociânico (t=3 dias). Cada uma destas porções foram

posteriormente analisadas quanto ao perfil físico-químico e nutricional nos diferentes tempos de armazenamento (0 e 3 dias).



Figura 18. Amostras de donuts com extrato antociânico (cor roxa) e donut controlo

3.9.2. Avaliação dos parâmetros de cor das amostras de “donuts” durante o tempo de armazenamento

A medição de cor foi efetuada no sentido de determinar a estabilidade do corante após incorporação (**Figura 19**), de acordo com o procedimento anteriormente descrito na secção 3.3.. A leitura foi realizada em 2 tempos distintos de armazenamento (t=0 dias e t=3 dias).



Figura 19. Medição das coordenadas CIE $L^* a^* b^*$ nos donuts

3.9.3. Avaliação da composição nutricional e química das amostras de “donuts”

Para avaliação do perfil nutricional dos “donuts” confeccionados, foram analisados os teores de humidade, cinzas (AOAC 923.03), gordura (AOAC 920.85), proteínas (AOAC 978.04) e hidratos de carbono, conforme os procedimentos da AOAC (2016) e seguindo uma metodologia anteriormente descrita na secção 3.4..

A composição química foi avaliada através da análise dos açúcares e ácidos gordos, tal como descrito anteriormente nas secções 3.5.1. e 3.5.3., respetivamente. A quantidade de

antocianinas nas amostras também foi determinada utilizando o procedimento descrito em 3.5.5.2..

3.10. *Análise estatística*

Os ensaios descritos foram realizados em triplicado e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (SD). Os dados para a avaliação dos parâmetros da cor dos frutos (frescos e desidratados), assim como, para avaliação dos parâmetros de cor dos “donuts” desenvolvidos, valor nutricional e composição química, foram analisados através do teste *t*-student, com o intuito de determinar as diferenças significativas entre 2 amostras, com *p*-value = 0,05 (SPSS v. 23.0; IBM Corp., Armonk, Nova Iorque, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação do valor nutricional e dos parâmetros de cor dos frutos de *Rubus ulmifolius*

Os resultados obtidos na análise nutricional dos frutos de *R. ulmifolius*, realizada de acordo com os métodos indicados na secção 3.3., estão presentes na **Tabela 6**. Os frutos de *R. ulmifolius* revelaram uma elevada concentração de hidratos de carbono, com valores de $26,2 \pm 0,2$ g/100 g de massa fresca (mf), e valores baixo de proteínas ($2,4 \pm 0,1$ g/100 g mf), seguido do teor em gordura ($1,22 \pm 0,02$ g/100g mf) e cinzas ($0,58 \pm 0,01$ g/100 g mf). Na presente avaliação foi, também, evidente a elevada proporção de humidade presente nos frutos com valores de 70 ± 2 g/100 g mf. A nível energético determinou-se um valor de $125,3 \pm 0,1$ kcal/100 g mf para estas amostras.

Vários estudos foram realizados em outras espécies de amoras, e os resultados mostram algumas diferenças na maioria dos parâmetros estudados. Num estudo de De Souza et al. (2014) foram analisados diversos frutos vermelhos, tais como: amora, framboesa vermelha, morango, cereja e mirtilo e os resultados mostraram valores diferentes comparativamente com o presente estudo; contudo as maiores e menores concentrações foram detetadas nos mesmos parâmetros em ambos os estudos. Estes autores apresentaram resultados para as diferentes amostras de amora (*Rubus* spp), tendo demonstrado elevada concentração em hidratos de carbono, com valores de 10,18 g/100 g mf, seguido de proteínas com valores de 1,27 g/100 g mf. As menores concentrações foram detetadas nos conteúdos de gordura e cinzas, apresentando valores de 0,42 g/100 g mf e 0,21 g/100 g mf, respetivamente. Por outro lado, as amostras evidenciaram um conteúdo de humidade significativamente maior, com valores de 87,92 g/100 g mf, sendo que o oposto foi observado no teor de energia (49,57 kcal/100 g mf), que foi consideravelmente menor em comparação aos frutos de *R. ulmifolius* estudados neste trabalho. A heterogeneidade observada na composição nutricional pode ser explicada por diferentes razões, nomeadamente pela diferente proveniência das amostras e, também, porque embora ambos tenham estudado o mesmo género, as espécies eram distintas (Pellegrini et al., 2018).

Os valores das coordenadas tridimensionais CIE ($L^*a^*b^*$) para a análise dos parâmetros de cor nos frutos de *R. ulmifolius* estão descritas na **Tabela 6**. A cor é um parâmetro muito importante na indústria alimentar, pois o aspeto visual de um produto gera um impacto inicial sobre o consumidor que, por vezes, é o fator decisivo para a aceitação ou não do

mesmo. Os frutos da amora têm uma cor muito intensa que permanece e caracteriza todos os produtos que deles derivam, tal como: marmelada, geleia, licores, gelados, entre outros (Kaume et al., 2012). L^* é a coordenada que representa a luminosidade, variando de branco (100) a preto (0). Os frutos frescos, neste parâmetro, revelaram valores de 19,7. Por outro lado, a coordenada a^* representa o eixo cromático de verde (-) a vermelho (+) e os frutos frescos mostraram um valor de 1,19. A coordenada b^* , que representa o eixo cromático de azul (-) a amarelo (+), exibiu um valor de 1,21 para os frutos frescos. Por outro lado, a cor também foi medida nos frutos após serem liofilizados e reduzidos a pó, e os resultados apresentaram valores de 18,8, 8,0 e 2,7 para os parâmetros L^* , a^* e b^* , respetivamente. A liofilização é um processo que permite obter um produto de alta qualidade; desta forma, é importante avaliar os seus efeitos, neste caso, no que diz respeito à mudança de cor, permitindo um pequeno rastreio dos pigmentos, tais como compostos antocianicos. De acordo com os resultados, foram evidentes as diferenças nas coordenadas a^* e b^* , provando que o processo de liofilização causou diferenças estatisticamente significativas nestes parâmetros de cor ($p < 0,05$). De outro modo, o parâmetro L^* não sofreu alterações significativas, após o referido processo de desidratação, mantendo a cor escura característica desta fruta.

O presente estudo não pode ser comparado com estudos anteriores, uma vez que estas análises não foram realizadas anteriormente na mesma espécie para os parâmetros considerados.

Tabela 6. Parâmetros nutricionais e parâmetro físico (cor - CIE $L^*a^*b^*$) dos frutos de *R. ulmifolius* (média \pm DP).

Valor nutricional	Fruto de <i>R. ulmifolius</i>	Cor	Frutos frescos	Frutos liofilizados	<i>p</i> -value
Humidade (g/100 g mf)	70 \pm 2	L^*	19,7 \pm 0,2	18,8 \pm 0,8	0,006
Cinzas (g/100 g mf)	0,58 \pm 0,01				
Proteínas (g/100 g mf)	2,4 \pm 0,1	a^*	1,19 \pm 0,05	8,0 \pm 0,3	<0,001
Gordura (g/100 g mf)	1,22 \pm 0,02				
Hidratos de carbono (g/100 g mf)	26,2 \pm 0,2	b^*	1,21 \pm 0,05	2,7 \pm 0,1	<0,001
Energia (Kcal/100 g mf)	125,3 \pm 0,1				

mf: massa fresca. L^* - luminosidade; a^* eixo cromático de verde (-) a vermelho (+); b^* , eixo cromático de azul (-) a amarelo (+). Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão

4.2. Determinação da composição química dos frutos de Rubus ulmifolius

Para obter o perfil químico dos frutos de *R. ulmifolius* foi analisada a composição e o respetivo teor em açúcares livres, ácidos orgânicos, tocoferóis e ácidos gordos, de acordo com os procedimentos descritos na secção 3.5.. Os resultados obtidos estão presentes na **Tabela 7**.

A análise no perfil de açúcares detetou a presença de dois monossacarídeos (frutose e glucose) e um dissacarídeo (sacarose), com um teor total em açúcares de $16,3 \pm 0,4$ g/100 g mf. A glucose e a frutose foram detetadas em concentrações maioritárias ($8,1 \pm 0,1$ g/100 g mf e $7,8 \pm 0,4$ g/100 g mf, respetivamente). Por outro lado, a sacarose evidenciou um teor muito inferior, apresentando valores de $0,34 \pm 0,02$ g/100 g mf.

O perfil em açúcares obtido no presente estudo está de acordo com um estudo realizado pelos autores Milivojevi et al. (2011), os quais detetaram moléculas de glucose (6,45 g/100 g mf), frutose (7,61 g/100 g mf) e sacarose (0,3 g/100 g mf) em frutos de *Rubus fruticosus* L., com valores idênticos aos encontrados nos frutos de *R. ulmifolius*.

Também num estudo realizado pelos autores Barros et al. (2010), pretendeu-se analisar as flores da *R. ulmifolius*, tendo-se identificado a presença de glucose (0,382 g/100 g massa seca (ms)), frutose (0,284 g/100 g ms) e sacarose (0,229 g/100 g ms), bem como outros açúcares, nomeadamente, trealose e rafinose, com teores de 0,72 e 0,10 g/100 g ms, respetivamente. Considerando que a análise foi realizada em partes distintas da planta, as diferenças detetadas eram previstas.

Tendo em consideração outros frutos vermelhos silvestres, nomeadamente, as espécies *Fragaria vesca* L. e *Rubus idaeus* L., a composição em açúcares demonstrou ser bastante semelhante, uma vez que foram identificadas as mesmas moléculas como maioritárias - glucose, frutose e sacarose. No caso da espécie *F. vesca*, a frutose revelou ser o açúcar predominante (11,68 g/100 g mf), seguida da glucose (6,52 g/100 g mf) e sacarose (2,74 g/100 g mf). Quanto à espécie *R. idaeus*, à exceção da sacarose (0,69 g/100 g mf), obteve-se igualmente quantidades inferiores em açúcares, com teores de 3,83 g/100 g mf em glucose e 3,5 g/100 g mf em frutose (Milivojevi et al., 2011).

É evidente que no presente estudo foi obtido um teor muito superior em açúcares livres, comparativamente a outras espécies silvestres. As diferenças evidenciadas poderão estar relacionadas, não só pelos diferentes métodos de extração e procedimentos analíticos aplicados, mas também pelo facto de serem espécies distintas.

É também, importante salientar que um alto conteúdo em açúcares, não significa, por si só, que o sabor final do fruto seja doce, dado que outros compostos interagem no mesmo, como é o caso dos ácidos orgânicos, que têm um grande impacto na palatabilidade dos alimentos (Maksimovic et al., 2011).

Deste modo, o perfil de ácidos orgânicos foi igualmente analisado e os resultados encontram-se descritos na **Tabela 7**. A análise evidenciou a presença de seis ácidos

orgânicos distintos, dos quais os ácidos oxálico, quinico, málico, chiquímico, ascórbico e fumárico, apresentando um conteúdo total de 238 ± 7 mg/100 g mf. De acordo com os resultados obtidos, o ácido quínico (119 mg/100 g mf) foi detetado como o composto maioritário, seguido dos ácidos oxálico (71 ± 4 mg/100 g mf), málico (29 ± 1 mg/100 g mf), chiquímico ($11,13 \pm 0,05$ mg/100 g mf) e ascórbico ($6,66 \pm 0,01$ mg/100 g mf), enquanto que o ácido fumárico foi detetado apenas em quantidades vestigiais.

O ácido quínico tem sido identificado em diversas frutas e vegetais, como sendo um dos principais compostos que contribui para o seu sabor característico (Marrubini et al., 2015). Neste contexto, diversos estudos foram realizados no sentido de apurar os efeitos benéficos desta molécula na saúde humana. Conti et al. (2013) e Papetti et al. (2013), determinaram que a mesma possui uma potente ação antioxidante e, sob efeitos sinérgicos com outras moléculas, nomeadamente os ácidos sucínico, oxálico e chiquímico, provou ter uma atividade inibitória contra microrganismos responsáveis por infeções virais na cavidade oral.

Os autores Milivojevi et al. (2011) realizaram um estudo no sentido de analisar as diferenças na composição química entre uma espécie de *Rubus* cultivada “Thornfree” e uma espécie de *Rubus* silvestre (*R. fruticosus*), e apenas detetaram ácido cítrico (0,10 mg/g mf em ambas), compostos não encontrado no presente estudo, e o ácido málico (0,17 e 0,03 mg/g mf, respetivamente).

No que diz respeito ao perfil de ácidos gordos (**Tabela 7**), a análise permitiu a identificação de vinte e cinco compostos, tendo-se destacado como maioritários o ácido linoleico (C18:2n6c) com uma percentagem relativa de $52,4 \pm 0,5$ %, seguindo-se o ácido α -linolénico (C18:3n3; $18,6 \pm 0,7$ %) e o ácido oleico (C18:1n9c; $18,4 \pm 0,1$ %).

Vários estudos têm sido levados a cabo, a fim de determinar os efeitos benéficos destes compostos na saúde humana. Os ácidos linoleico e α -linolénico são designados por ácidos gordos essenciais, uma vez que, não tendo o organismo capacidade para os sintetizar, estes têm de ser obtidos através da dieta. Para além disso, são precursores de diversas substâncias com importantes funções no organismo (Anez-Bustillos et al., 2018).

Quanto ao ácido linoleico (ómega 6), este corresponde ao precursor de uma importante cascata de síntese de outras moléculas importantes, como por exemplo o ácido araquidónico, que por sua vez é substrato da cicloxigenase, lipoxigenase e enzimas do citocromo P450, os quais são geradores de eicosanóides e mediadores de resolução da

inflamação, com inúmeras funções fisiológicas (Anez-Bustillos et al., 2018; Innes & Calder, 2018; Mori, 2018; Tallima & Ridi, 2018).

Por outro lado, o ácido α -linolénico (ómega 3, ω -3) é o precursor de síntese de outros ácidos gordos ómega 3 polinsaturados, através de uma cascata de reação, tais como o EPA (ácido eicosapentanoico) e o DHA (ácido docosahexanoico), considerados como os ω -3 com maiores benefícios fisiológicos a nível cardiovascular, intervindo no controlo dos níveis de triglicéridos plasmáticos, arritmias, pressão arterial e formação de trombos, melhorando, desta forma, a função vascular. No geral, os ácidos gordos ómega 3 encontram-se envolvidos no controlo de peso corporal e prevenção do desenvolvimento de inflamações crónicas, principalmente, através de efeitos na microbiota intestinal (Zhang et al., 2018).

Entre os ácidos detetados com concentrações significativas, encontram-se igualmente os ácidos palmítico (C:16) e esteárico (C18:0), com percentagens de $5,3 \pm 0,2$ e $2,94 \pm 0,03$ %, respetivamente. Quanto aos restantes ácidos gordos caracterizados, foram quantificados em concentrações inferiores a 1%.

Um estudo realizado por Morales et al. (2013), onde se pretendia identificar potenciais compostos fitoquímicos em frutos silvestres comestíveis, foi detetado um perfil em ácidos gordos semelhante aos frutos de *R. ulmifolius*. Os mesmos autores quantificaram, igualmente, os ácidos linoleico, oleico e o α -linolénico como compostos maioritários, com respetivos teores de 48,56, 22,62 e 13,28 %.

Também os autores Fazio et al. (2013) avaliaram a composição e propriedades do extrato metanólico das sementes de 2 espécies de frutos silvestres (*R. ulmifolius* e *Sambucus nigra* L.) e a análise às sementes da espécie *R. ulmifolius* evidenciou os ácidos linoleico (15,34 g/100 g_{óleo}), α -linolénico (4,22 g/100 g_{óleo}) e oleico (8,33 g/100 g_{óleo}) como maioritários.

Além dos estudos descritos, também os autores Barros et al. (2010) analisaram a composição química das flores e dos botões florais da espécie *R. ulmifolius*, tendo caracterizado no total 23 ácidos gordos distintos. Nesta análise, destacaram-se os ácidos α -linolénico (38,04 e 39,56 %, respetivamente), linoleico (14,98 e 16,02 %, respetivamente) e palmítico (12,05 e 11,99 %, respetivamente).

De um modo geral, a análise dos frutos de *R. ulmifolius* realizada evidenciou uma percentagem superior em ácidos gordos polinsaturados (PUFA – $71,4 \pm 0,2$ %) em relação aos monoinsaturados (MUFA – $18,8 \pm 0,1$ %) e aos saturados (SFA – $9,7 \pm 0,3$ %). Os

resultados obtidos estão de acordo com estudos anteriormente realizados, nomeadamente por Fazio et al. (2013), no qual se detetou uma percentagem superior em PUFA (19,56 %) seguida de SFA (3,47 %), no óleo das sementes destes frutos; e também por Barros et al. (2010), com uma percentagem de 53,56 % de PUFA e 42,99 % de SFA, numa análise realizada às flores da mesma espécie.

Um dos fatores que se considera relevante na avaliação da qualidade de um alimento é o valor da relação PUFA/SFA, sendo que esta deve apresentar valores superiores a 0,45 (Ospina-E et al., 2012; Morales et al., 2013; Rincón-Cervera et al., 2019) para que haja um equilíbrio das concentrações de colesterol no plasma, com a consequente prevenção de doenças cardiovasculares (Rincón-Cervera et al., 2019). No presente estudo, a análise realizada a estes frutos determinou um valor de 7,40, evidenciando uma boa qualidade nutricional do fruto.

A análise realizada ao perfil de tocoferóis, está patente na **Tabela 7**. Nas amostras analisadas, foram detetadas todas as isoformas, designadamente α -, β -, γ - e δ -tocoferol, com um teor total de $5,1 \pm 0,1$ mg/100 g mf. O γ -tocoferol foi quantificado como a isoforma maioritária ($2,80 \pm 0,04$ mg/100 g mf), seguida de α - e δ -tocoferol com teores semelhantes entre eles ($1,15 \pm 0,04$ e $1,13 \pm 0,04$ mg/100 g mf, respetivamente). O β -tocoferol foi detetado numa concentração reduzida, apresentando um valor de $0,020 \pm 0,002$ mg/100 g mf.

Vários estudos realizados têm associado o γ -tocoferol a uma ação inibitória no desenvolvimento de trombose arterial, no processo de oxidação de LDL, assim como, na geração do radical superóxido e peroxidação lipídica. Não obstante, foi também descrito que, um consumo regular de alimentos com teor elevado desta isoforma, diminui o risco de enfarte do miocárdio e morte por doença isquémica cardíaca (Nadeem et al., 2012).

Apesar de todas as isoformas estarem presentes no fruto em estudo, é atribuída uma importância fundamental ao α -tocoferol. Segundo os autores Campbell et al. (2003), o efeito antioxidante associado aos tocoferóis é devido principalmente à ação do α -tocoferol, sendo a principal isoforma de vitamina E presente em suplementos. No presente estudo, este composto foi detetado como o segundo maioritário nos frutos de *R. ulmifolius*.

Os resultados obtidos estão de acordo com um trabalho realizado por Morales et al. (2013), no qual se detetou um teor total de tocoferóis de 13,48 mg/100 g mf nos frutos silvestres da mesma espécie em estudo, com teores semelhantes para γ -tocoferol (3,73

***Rubus ulmifolius* Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos**

mg/100 g mf), δ -tocoferol (3,69 mg/100 g mf) e α -tocoferol (3,38 mg/100 g mf), e em concentrações inferiores para β -tocoferol (0,24 mg/100 g mf).

Já num estudo realizado por Fazio et al. (2013), no qual foi estudado o óleo de sementes dos frutos de *R. ulmifolius*, determinou-se um teor total de 43,71 $\mu\text{g/g}_{\text{óleo}}$ em tocoferóis, destacando-se a isoforma γ -tocoferol com valores de 43,35 $\mu\text{g/g}_{\text{óleo}}$, e a isoforma α -tocoferol em concentração significativamente inferior (0,36 $\mu\text{g/g}_{\text{óleo}}$). Já as isoformas β - e δ -tocoferol não foram detetadas.

Também nos botões florais e flores desta espécie foram detetadas todas as isoformas (α -, β -, γ - e δ -) de tocoferol, com um teor total de 12,28 e 9,86 mg/100 g ms (massa seca), respetivamente (Barros et al., 2010), sendo a molécula maioritária o α -tocoferol (5,97 e 5,84 mg/100 g ms, respetivamente). As diferenças encontradas nos estudos descritos poderão estar relacionadas com a parte da planta analisada e as diferentes espécies mencionadas.

Tabela 7. Composição química (açúcares, ácidos orgânicos, tocoferóis e ácidos gordos) dos frutos de *R. ulmifolius* (média \pm DP).

Açúcares (g/100 g mf)		Ácidos gordos (%)			
Frutose	7,8 \pm 0,4	C11:0	0,073 \pm 0,001	C21:0	0,023 \pm 0,002
Glucose	8,1 \pm 0,1	C12:0	0,10 \pm 0,01	C20:4n6	0,086 \pm 0,001
Sacarose	0,34 \pm 0,02	C13:0	0,026 \pm 0,001	C20:3n3	0,026 \pm 0,001
Total	16,3 \pm 0,4	C14:0	0,09 \pm 0,01	C22:0	0,33 \pm 0,02
Ácidos orgânicos (mg/100 g mf)		C15:0	0,037 \pm 0,001	C20:5n3	0,015 \pm 0,001
Ácido oxálico	71 \pm 4	C16:0	5,3 \pm 0,2	C22:2	0,029 \pm 0,002
Ácido quínico	119 \pm 10	C16:1	0,057 \pm 0,001	C24:0	0,09 \pm 0,01
Ácido málico	29 \pm 1	C17:0	0,15 \pm 0,01	SFA	9,7 \pm 0,3
Ácido chiquímico	11,33 \pm 0,05	C17:1	0,075 \pm 0,004	MUFA	18,8 \pm 0,1
Ácido ascórbico	6,66 \pm 0,01	C18:0	2,94 \pm 0,03	PUFA	71,4 \pm 0,2
Ácido fumárico	tr	C18:1n9c	18,4 \pm 0,1	PUFA/SFA	7,4 \pm 0,2
Total	238 \pm 7	C18:2n6t	0,110 \pm 0,001		
Tocoferóis (mg/100 g mf)		C18:2n6c	52,4 \pm 0,5		
α -tocoferol	1,15 \pm 0,04	C18:3n6	0,069 \pm 0,001		
β -tocoferol	0,020 \pm 0,002	C18:3n3	18,6 \pm 0,7		
γ -tocoferol	2,80 \pm 0,04	C20:0	0,63 \pm 0,03		
δ -tocoferol	1,13 \pm 0,04	C20:1	0,27 \pm 0,01		
Total	5,1 \pm 0,1	C20:2	0,038 \pm 0,001		

tr- quantidades vestigiais; mf- massa fresca; SFA- ácidos gordos saturados; MUFA- ácidos gordos monoinsaturados; PUFA- ácidos gordos polinsaturados. Ácido undecanóico (C11:0); Ácido dodecanóico (C12:0); Ácido tridecanóico (C13:0); Ácido mirístico (C14:0); Ácido Pentadecanóico (C15:0); Ácido palmítico (C16:0); Ácido palmitoleico (C16:1); Ácido heptadecanóico (C17:0); Ácido heptadecenóico (C17:1); Ácido esteárico (C18:0); Ácido oleico (C18:1n9c); Ácido linoleico (C18:2n6c-t); Ácido α -linoléico (C18:3n3); Ácido linoleico (C18:3n6c); Ácido araquídico (C20:0); Ácido Gadoleico (C20:1); Ácido cis-11,14-Eicosadienóico (C20:2); Ácido cis-11,14,17-eicosatrienóico (C20:3n3); Ácido Araquidónico (C20:4n6); Ácido eicosapentanoico (20:5n3); Ácido heneicosanoico (C21:0); Ácido beénico (C22:0); Ácido docosadienoico (C22:2); Ácido lignocérico (C24:0). Os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão.

4.3. Determinação da composição fenólica dos frutos de *Rubus ulmifolius*

Os resultados relativos ao perfil de compostos fenólicos, não antociânicos e antociânicos, dos extratos hidroetanólicos dos frutos de *R. ulmifolius* foi determinado e os resultados

encontram-se descritos na **Tabela 8**. A identificação destes compostos foi obtida de acordo com os tempos de retenção (Tr), o espectro UV-Vis e os padrões de fragmentação de massa.

A análise realizada, revelou a presença de onze compostos não antociânicos (4 ácidos fenólicos, 2 dihidroflavonois, 3 flavonois, 1 flavonona e 1 elagitanino) e cinco compostos antociânicos (derivados glicosilados de cianidina e pelargonidina) (**Figura 20**).

Entre os compostos fenólicos não antociânicos, identificaram-se os picos numerados por 1, 2, 7 e 8 como ácidos fenólicos. O pico 1 ($[M-H]^-$ a m/z 341) apresenta um fragmento MS^2 a m/z 179 ($[\text{ácido cafeico-H}]^-$) apresentando uma perda de um resíduo hexosilo (-162 u), sendo que por tentativa, se identificou como um hexósido de ácido cafeico. Já o pico 2 ($[M-H]^-$ a m/z 353) revelou características de um ácido cafeoilquinico e considerando o padrão de fragmentação descrito pelos autores Clifford et al. (2005), foi identificado como ácido 4-*O*-cafeoilquinico. Os compostos 7 ($[M-H]^-$ a m/z 433) e 8 ($[M-H]^-$ a m/z 477), que apresentam ambos espectro UV-Vis semelhante ao ácido elágico e fragmentos MS^2 a m/z 301 ($[\text{ácido elágico-H}]^-$), resultado da perda de um pentosilo (-132 u) e um glucuronilo respetivamente, tendo sido tentativamente identificados como um pentósido de ácido elágico e glucurónido de ácido elágico, respetivamente.

O composto 6 ($[M-H]^-$ a m/z 1567) foi detetado como o único tanino hidrossolúvel nos frutos de *R. ulmifolius*, foi identificado como sanguin H-10, com base nos padrões de fragmentação anteriormente descritos pelos autores, num estudo realizado em botões florais e flores abertas da mesma espécie (Martins et al., 2014).

Os compostos numerados de 3-5 e 9-11 foram identificados como glicosídeos de flavonóide não antociânicos. Os picos 3 e 9, que apresentam o mesmo ião pseudomolecular ($[M-H]^-$ a m/z 465), foram identificados como derivados de taxifolina, apresentando um fragmento MS^2 a m/z 303 (taxifolina; $[M-H-162]^-$ perda de um resíduo hexosilo). Com base nos dados descritos, os compostos foram identificados como isómeros de taxifolina-*O*-hexósido. No mesmo sentido, os picos 4 ($[M-H]^-$ a m/z 449) e 5 ($[M-H]^-$ a m/z 609) foram identificados como eriodictiol-*O*-hexósido e Kaempferol -*O*-di-hexósido, respetivamente. Os compostos 10 ($[M-H]^-$ a m/z 607) e 11 ($[M-H]^-$ a m/z 591) foram identificados como quercetina-HMG-glucósido e quercetina-HMG-ramnósido, respetivamente; de acordo com dados descritos em amostras de *Rubus* sp. (McDougall et al., 2011; Tavares et al., 2012).

Ainda em relação aos compostos não antociânicos, como compostos maioritários detetaram-se o pentósido de ácido elágico ($13,2 \pm 0,4$ mg/g de extrato), seguido do glucurónido de ácido elágico ($10,7 \pm 0,1$ mg/g de extrato) e por fim, o composto sanguíin H-10 ($9,6 \pm 0,1$ mg/g de extrato).

Além dos derivados de ácido elágico foram também detetados, em quantidades moderadas, derivados do ácido cafeico (pico 1 e 2) e glicósidos de flavonoide não antociânicos (picos 3, 4, 5, 9, 10 e 11) no extrato dos frutos de *R. ulmifolius*, com uma percentagem de aproximadamente 10-20%, relativamente à composição total de compostos fenólicos.

O perfil de compostos fenólicos dos frutos de *R. ulmifolius*, foram anteriormente caracterizados por Ruiz-Rodríguez et al. (2014), numa amostra proveniente de Espanha. No entanto, o resultado obtido por estes autores evidenciou um perfil fenólico totalmente distinto do obtido no presente estudo, facto este que pode ser explicado pela distinta proveniência geográfica das amostras e pelas diferentes condições de extração aplicadas, nomeadamente pelo solvente utilizado.

Relativamente aos compostos antociânicos, os picos 13 (cianidina-3-*O*-glucósido) e 14 (pelargonidina-3-*O*-glucósido) foram identificados positivamente com padrões comerciais. O composto 12 ($[M+H]^+$ a m/z 611) apresentou um padrão de fragmentação de MS^2 a m/z 287 (cianidina; $[M-H-162-162]^-$, perda de 2 porções hexosilo) sendo identificado como cianidina-*O*-di-hexósido. O pico 15 ($[M+H]^+$ a m/z 419) e o pico 16 ($[M+H]^+$ a m/z 593) foram caracterizados como cianidina-3-*O*-xylosido e cianidina-3-*O*-dioxyl-glucosido, respetivamente. Tal identificação foi obtida com base numa caracterização realizada pelos autores Tavares et al. (2012), em amostras de amoras pretas.

De um modo geral, o perfil de compostos fenólicos dos frutos de *R. ulmifolius* evidenciou uma composição maioritária em compostos antociânicos ($23,8 \pm 0,1$ mg/g extrato), com uma percentagem de 35% relativamente à totalidade de compostos fenólicos identificados, incluindo diversos glicósidos de cianidina e um glicósido de pelargonidina; sendo a cianidina-3-*O*-glucósido ($14,7 \pm 0,04$ mg/g de extrato) identificada como o composto antociânico maioritário. A antocianina referida, foi também, anteriormente quantificada como maioritária nos frutos da mesma espécie por Ruiz-Rodríguez et al. (2014). No entanto, nenhum dos outros compostos antociânicos identificados no presente

***Rubus ulmifolius* Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos**

estudo foi anteriormente descrito, facto que pode ser explicado pela diferente proveniência da espécie, assim como pelos distintos métodos de extração aplicados.

Tabela 8. Tempo de retenção (Tr), comprimento de onda de máxima absorção na região do visível (λ_{max}), dados dos espetros de massa, tentativa de identificação e quantificação dos compostos não antociânicos e antociânicos dos frutos de *R. ulmifolius* (média \pm DP).

Pico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	Tentativa de identificação	[M-H]⁻	Fragmento ESI- MSⁿ [intensidade (%)]	Quantificação (mg/g extrato)
1	5,58	320	Ácido cafeico hexósido	341	MS ² [341]: 179(100)	1,6 \pm 0,1
2	6,72	324	4- <i>O</i> -CQA	353	MS ² [353]: 191(12),179(51),173(100),155(8),135(5)	3,1 \pm 0,1
3	7,97	-	Taxifolina- <i>O</i> -hexósido isomero 1	465	MS ² [465]: 303(100)	2,3 \pm 0,1
4	9,62	-	Eriodictiol- <i>O</i> -hexósido	449	MS ² [449]: 287(100)	0,94 \pm 0,02
5	11,05	343	Kaempferol - <i>O</i> -di-hexósido	609	MS ² [609]: 285(100)	1,18 \pm 0,02
6	14,48	285	Sanguiin H-10	1567	MS ² [1567]: 1265(11),1235(23),1103(5),935(7),783(12),633(48),301(41)	9,6 \pm 0,1
7	17,66	360	Ácido elágico pentósido	433	MS ² [433]: 301(100)	13,2 \pm 0,4
8	18,20	361	Ácido elágico glucuronido	477	MS ² [477]: 301(100)	10,7 \pm 0,1
9	18,95	278,328	Taxifolina- <i>O</i> -hexósido isomero 2	465	MS ² [465]: 303(100)	1,60 \pm 0,02
10	20,84	355	Quercetina-HMG-glucósido	607	MS ² [607]: 463(53), 301(100)	2,1 \pm 0,1
11	23,68	355	Quercetina-HMG-ramnósido	591	MS ² [591]: 447(47), 301(100)	1,55 \pm 0,02
AFT						28,7 \pm 0,7
FTNA						9,68 \pm 0,03
ET						9,6 \pm 0,1
CFTNA						47,9 \pm 0,8
Pico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	Tentativa de identificação	[M+H]⁺	Fragmento ESI- MSⁿ [intensidade (%)]	Quantificação (mg/g extract)
12	27,61	517	Cianidina- <i>O</i> -di-hexósido	611	287(100)	2,14 \pm 0,02
13	29,02	516	Cianidina-3- <i>O</i> -glucósido	449	287(100)	14,69 \pm 0,04
14	31,08	502	Pelargonidina-3- <i>O</i> -glucósido	433	271(100)	2,234 \pm 0,003
15	32,05	518	Cianidina-3- <i>O</i> -xilósido	419	287(100)	2,62 \pm 0,02
16	32,52	519	Cianidina-3- <i>O</i> -dioxail-glucósido	593	287(100)	2,04 \pm 0,03
CAT						23,7 \pm 0,1

AFT- ácidos fenólicos totais; FTNA – flavonoides totais não antociânicos; ET- elagitaninos totais; CFTNA – compostos fenólicos totais não-antociânicos; CAT – compostos antociânicos totais

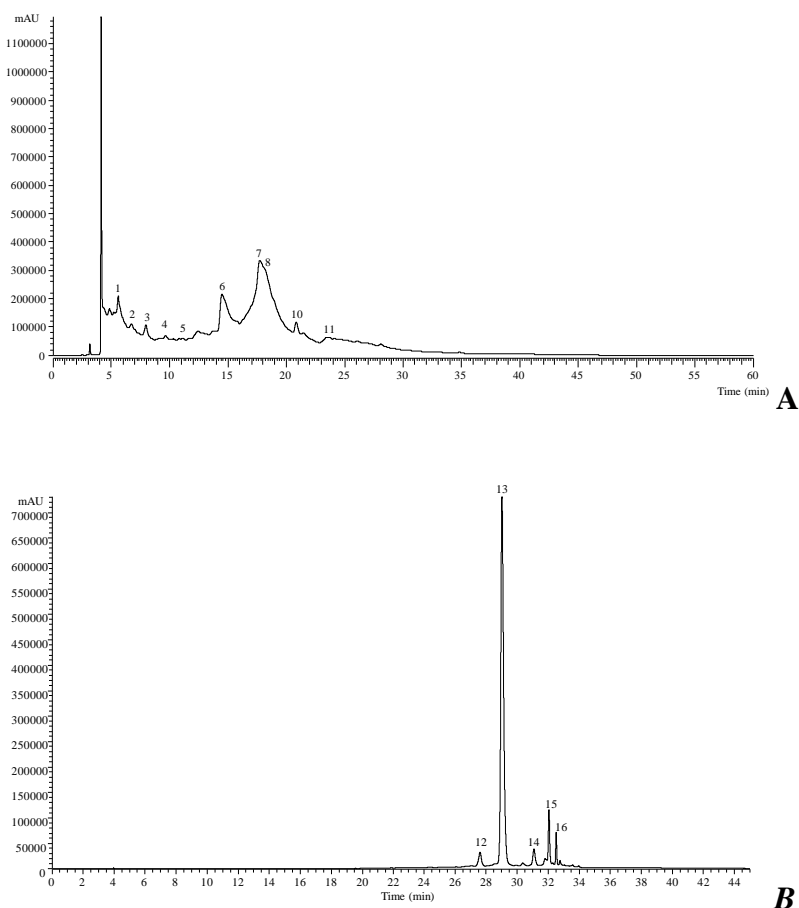


Figura 20. Cromatograma dos compostos fenólicos encontrados nos frutos de *R. ulmifolius* obtidos a 280 (A) e 520 (B) nm. Os números dos picos identificados, correspondem aos identificados na **Tabela 8**.

4.4. Avaliação do potencial bioativo de frutos de *Rubus ulmifolius*

4.4.1. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos frutos *R. ulmifolius* foi realizada num extrato hidroetanólico descrito na secção 3.5.5.1., e os resultados estão descritos na **Tabela 9**. Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram uma atividade antimicrobiana em diversas estirpes, sendo que, no geral, os valores de CMI se encontram entre 5 e > 20 mg/mL. Entre todas as bactérias testadas, a amostra dos frutos apresentou um efeito bacteriostático contra todas as estirpes, com exceção da *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, ambas bactérias Gram-negativas, dado ser necessária uma concentração acima de 20 mg/mL para se obter um efeito de inibição de crescimento contra as mesmas. Para as restantes bactérias Gram-negativas, o maior efeito foi obtido para *Morganella morganii* (CMI = 5 mg/mL) e *Escherichia coli* (CMI = 5 mg/mL), seguida de *Proteus mirabilis* (CMI = 10 mg/mL), sendo que a primeira estirpe provou ser mais suscetível ao

extrato do que à ampicilina, usada como controlo positivo. No que concerne às bactérias Gram-positivos, os extratos avaliados apresentaram igualmente uma atividade bacteriostática contra todas as estirpes, sendo que as estirpes *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e MSSA foram as mais suscetíveis ao seu efeito (CMI = 5 mg/mL), seguida da MRSA (CMI = 10 mg/mL).

A atividade antimicrobiana de extratos hidrometanolicos de botões florais e flores de *R. ulmifolius* foi também estudada pelos autores Gomes et al. (2018), contra várias estirpes de *Staphylococcus aureus*. A análise evidenciou um efeito moderado, o que significa que houve um efeito bacteriostático. No entanto, um estudo realizado por Hajaji et al. (2017), que pretendeu avaliar as bioatividades de extratos metanolicos de *R. ulmifolius* proveniente da Tunísia, recorreu ao ensaio de difusão e não obteve resultados significativos contra a estirpe *S. aureus*.

Os resultados obtidos no presente estudo provaram ser bastante promissores, já que os extratos exibiram uma atividade efetiva contra microrganismos isolados de um centro hospitalar, que estão associados a um largo espectro de resistência. Tal eficiência pode ser explicada pela composição fenólica presente no extrato.

Esta correlação foi comprovada pelos autores Kemperman et al. (2010), que descrevem que os mecanismos associados à atividade antimicrobiana por parte dos compostos fenólicos, estarão relacionados com interações composto-membrana, inibição do DNA girase (ou topoisomerase) e efeito quelante sobre metais.

Relativamente ao fungo testado, *Candida albicans*, o extrato exibiu, da mesma forma, um efeito fungistático (CMI = 5 mg/mL). Uma atividade eficiente contra *C. albicans* foi também descrito pelos autores Panizzi et al. (2002), os quais avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de *R. ulmifolius* (folhas, ramos e sumidades floridas), provenientes de Itália. Nesse estudo, diversos extratos foram preparados com recurso a solventes de diferentes polaridades, no qual o metanol surgiu como o solvente mais efetivo e a água como o menos efetivo.

De um modo geral, o presente estudo, nos frutos de *R. ulmifolius*, não mostrou efeitos bactericida e fungicida significativos, de modo a ocorrer uma eliminação efetiva dos microrganismos (CMB e CMF > 20), tendo, no entanto, demonstrado um potencial efeito bacteriostático e fungistático na maioria das estirpes testadas.

Um estudo anteriormente realizado por Hajaji et al. (2017), o qual pretendeu avaliar diversas bioatividades de um extrato metanolicos dos frutos de *R. ulmifolius* (Tunísia),

***Rubus ulmifolius* Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos**

concluiu que estes exerciam um potente efeito bacteriostático/fungistático nomeadamente, contra as estirpes *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Candida albicans*, segundo o ensaio da difusão em agar. E ainda, através do ensaio de microdiluição em placa, os autores obtiveram valores de CMI e CMB semelhantes ao presente estudo, nomeadamente, contra *E. coli* ATCC 8739 (CMI = 4,03 mg/mL; CMB = 8,92 mg/mL). Resultados positivos foram igualmente obtidos para *S. aureus* (CMI = 3,22 mg/mL; CMB = 7,17 mg/mL) e *C. albicans* (CMI = 3,17 mg/mL; CMB = 7,25 mg/mL).

A heterogeneidade observada nos estudos descritos pode ser justificada, em parte, pela localização geográfica distinta das amostras que, devido a diferentes condições ambientais, nomeadamente, o clima e tipo de solo, incitam a uma composição química distinta. Para além do fator geográfico, também os solventes de extração e métodos aplicados para cada ensaio, têm igualmente um grande impacto na composição química do extrato e, conseqüentemente, nas bioatividades demonstradas (Dai et al., 2009; Hajaji et al., 2017).

Tabela 9. Resultados da avaliação da atividade antimicrobiana (valores de CMI e CMB; mg/mL) de extratos hidroetanólicos dos frutos de *R. ulmifolius*.

	Amostra		Controlos							
	Extrato dos frutos de <i>R. ulmifolius</i>		Ampicilina		Imipenem		Vancomicina		Fluconazol	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMF
Bactérias Gram-negativos										
<i>Escherichia coli</i>	5	>20	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>20	>20	10	20	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Morganella morganii</i>	5	>20	20	>20	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Proteus mirabilis</i>	10	>20	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>20	>20	>20	>20	0,5	1	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Bactérias Gram-positivos										
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	>20	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	>20	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
MRSA	10	>20	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.
MSSA	5	>20	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	0,25	0,5	nt	nt
Fungos										
<i>Candida albicans</i>	CMI	CMF								
	5	>20	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	0,06	0,06

n.t. – não testada; MRSA- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; MSSA- *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina; CMI- concentração mínima inibitória; CMB/CMF - concentração mínima bactericida/fungicida.

4.4.2. Atividade citotóxica

Na avaliação da citotoxicidade dos extratos hidroetanólicos (obtidos a partir do processo descrito na secção 3.5.5.1) dos frutos de *R. ulmifolius* foi evidente a ausência de capacidade antiproliferativa em todas as linhas celulares estudadas ($GI_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$). Contudo, os valores obtidos para os ensaios de hepatotoxicidade (realizado numa cultura celular primária não-tumoral - PLP2) foram satisfatórios, revelando ausência de toxicidade do extrato ($GI_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$).

4.5. Otimização do processo de extração de um corante natural à base de antocianinas obtido a partir dos frutos de *Rubus ulmifolius* aplicando uma MSR

Apesar da existência de estudos que relatam a extração de antocianinas de matrizes naturais (Mane et al., 2015; Backes et al., 2018; Blackhall et al., 2018; López et al., 2018), são inexistentes os estudos que descrevem a extração destes compostos a partir de frutos de *R. ulmifolius*, não havendo, desta forma, informação disponível à cerca das condições ótimas que maximizem a extração a partir destes frutos. Para além disso, a grande diversidade e distinta concentração de antocianinas presente nas diversas matrizes naturais, não permite uma extrapolação direta das condições ótimas de extração destes pigmentos de matrizes previamente estudadas (Pinela et al., 2019).

Desta forma, o primeiro passo para otimizar a um processo de extração (e.g. HAE) e, portanto, obter uma extração eficiente de antocianinas dos frutos de *R. ulmifolius*, consiste na aplicação de uma metodologia de superfície de resposta.

MSR é um método que permite ao investigador compreender os padrões de múltiplas variáveis e as possíveis interações complexas que poderão decorrer sobre as respostas que pretendem ser avaliadas (Bezerra et al., 2008). Permite, também, obter facilmente as condições ideais para maximizar ou minimizar tais respostas. Para este objetivo, estão descritos vários modelos experimentais, sendo que cada um apresenta vantagens e desvantagens; no entanto, de forma geral, a aplicação deste permite minimizar significativamente o número de ensaios necessários a realizar. Neste sentido, o desenho experimental *DCCC* (desenho composto central circunscrito) associado a 5 níveis por fator, tem sido amplamente aplicado em vários estudos de MSR, com o objetivo de

otimizar vários métodos de processamento de alimentos (Pinela et al., 2016; Oludemi et al., 2018).

Com a finalidade de obter uma otimização das condições de extração de antocianinas, aplicou-se um desenho experimental *DCCC* associado a 5 níveis para as 3 variáveis independentes, segundo as seguintes variáveis e respetivos intervalos: t (20-120 min), T (20-90 °C) e S (0-100%). Uma descrição detalhada dos valores naturais codificados das variáveis seleccionadas para o desenho experimental de *DCCC* encontra-se na **Tabela 5** (seção 3.7.5.1.). Por sua vez, a **Figura 21** esquematiza, de uma forma breve, os diferentes passos aplicados no processo de otimização da extração de compostos antociânicos.

Rubus ulmifolius Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos

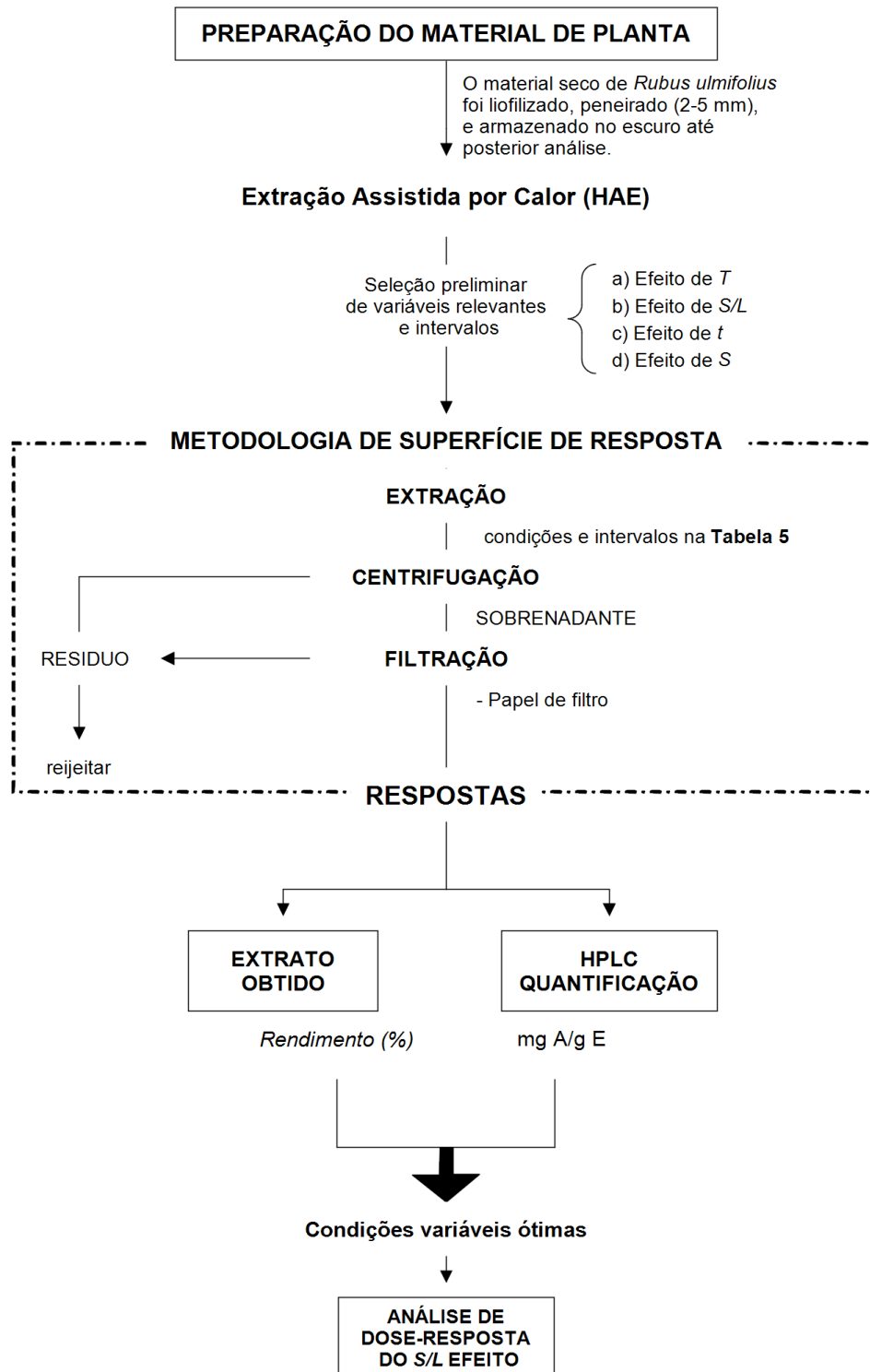


Figura 21. Diagrama representativo das etapas realizadas no decorrer da otimização das condições que maximizam as respostas de extração (mg A/g E dw) de antocianinas e o resíduo total extraído (*Rendimento, %*)

4.5.1. *Análise MSR, verificação estatística e efeito das variáveis de extração na resposta*

Os resultados da resposta utilizados para otimizar a extração das antocianinas foram o conteúdo em antocianinas (conteúdo individual e total) e o rendimento de extração, de acordo com o modelo experimental *DCCC* (**Tabela 5**, seção 3.7.5.1.) e os resultados podem ser consultados na **Tabela 10**. O rendimento de extração obtido varia de 40,44 a 74,03 %. De acordo com o descrito anteriormente, o composto antociânico A2 (cianidina-3-*O*-glucósido) predomina em relação às restantes moléculas (A3 a A5), apresentando concentrações de 2,91 a 24,06 mg A/g E. Relativamente aos restantes compostos, os níveis alteram conforme: A3 (pelargonidina-3-*O*-glucósido; de 1,03 a 3,09 mg/g E), A4 (cianidina-3-*O*-xilósido; de 1,15 a 6,45 mg/g E) e A5 (cianidina-3-*O*-dioxail-glucósido; de 0,56 a 2,16 mg/g E). De um modo geral, o valor total do conteúdo de antocianinas (AT) varia de 5,87 a 35,55 mg/g E (**Tabela 10**).

Os diferentes critérios de resposta utilizados são de extrema conveniência para os sectores industriais, os quais lidam com a extração de compostos de alto potencial, a partir de materiais vegetais, com o intuito de serem aplicados como corantes naturais; ou ainda, outros ingredientes baseados num conceito biológico, fornecendo informações a cerca da quantidade de material vegetal necessário para obter uma determinada quantidade de compostos alvo e a respetiva concentração presente nos extratos obtidos.

Os valores paramétricos do modelo polinomial de segunda ordem (**Equação 3**), obtido após ajuste dos valores de resposta de extração e as correspondentes informações estatísticas ($\alpha = 0,05$) encontram-se descritas na **Tabela 11** (partes A e B). O procedimento de ajuste à **Equação 3**, aplicado às respostas experimentais foi realizado através de uma equação polinomial de segunda ordem, sendo que os valores não significativos (*ns*) foram excluídos.

Uma vez que os modelos são validados por análise estatística (**Tabela 11**, partes A e B), é possível determinar os valores ótimos das variáveis para maximizar as respostas individualmente e globalmente, com a finalidade de determinar quais as condições de extração mais eficientes. Na **Tabela 11** (parte C) encontram-se também descritos os valores de resposta ótima individual e global para a técnica HAE, assim como, as correspondentes condições para as respostas avaliadas.

Embora os valores paramétricos sejam úteis para descrever as respostas e proporcionar uma maior compreensão dos padrões de resposta, os gráficos de superfície 3D surgem como uma melhor estratégia para representar os efeitos de qualquer variável independente numa determinada resposta, variando duas variáveis no intervalo experimental em estudo e mantendo a outra variável no seu nível fixo.

Neste sentido, a **parte A** da **figura 22** e da **figura 23**, representam os gráficos 3D de superfície de resposta, os quais descrevem a influência dos efeitos estudados para os parâmetros de HAE durante o processo de extração. Os gráficos permitem visualizar a influência e interação entre as variáveis. A análise visual dos gráficos de superfície 3D encontra-se em concordância com os valores paramétricos obtidos na análise de regressão múltipla, conforme descrito na **Tabela 11**.

Os resultados de extração para HAE em função da combinação das três variáveis principais envolvidas (X_{1-3} : t , T e S) podem ser observados na **Figura 22** e na **Figura 23**. De uma forma mais detalhada, na **Figura 22** (parte A) estão representados os gráficos de superfície 3D relativa ao rendimento de extração (*Rendimento*, %), o teor total de antocianinas (AT, mg AT/g E) e o composto antociânico detetado em maior concentração (A2, mg A2/g E). Por outro lado, na **Figura 23** (parte A) estão representados os gráficos de superfície 3D com os resultados relativos ao teor das restantes três antocianinas, detetadas em menor quantidade (A3 a A5, em mg A/g E).

As ilustrações gráficas representadas permitem uma visualização mais simplificada das tendências de cada resposta e, desta forma, considerando simultaneamente todas as respostas, orientaram para a interpretação e seleção das condições mais favoráveis.

A **parte B** da **Figura 22** e **Figura 23**, representa a capacidade de prever os resultados obtidos e a distribuição dos resíduos em função de cada uma das variáveis consideradas. Em termos estatísticos, a distribuição de resíduos (**Figura 22 e 23, parte B**) apresenta, para a maioria, mais de 90% de confiabilidade, demonstrando uma boa concordância entre os valores experimentais obtidos e os previstos pelo modelo. O mesmo pode ser verificado pelos valores de R^2 elevados (**Tabela 11**), os quais indicam a percentagem de variabilidade explicada pelo modelo.

***Rubus ulmifolius* Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos**

Tabela 10. Resultados experimentais de MSR do DCCC para a otimização das três variáveis principais envolvidas (X_1 , X_2 e X_3) na HAE, para os formatos de valores de resposta (mg A/g E e *Rendimento*, %). Descrição das variáveis, valores naturais e intervalos. Foram realizadas três repetições para cada condição.

	VALORES CODIFICADOS			HAE			EXTRATO	CONTEUDO INDIVIDUAL DE COMPOSTOS				CONTEÚDO TOTAL
	X_1	X_2	X_3	$X_1: t$ min	$X_2: T$ °C	$X_3: S$ %	Rendimento %	A2 mg/g E	A3 mg/g E	A4 mg/g E	A5 mg/g E	AT mg/g E
1	-1	-1	-1	40,3	34,2	20,3	59,89	10,68	1,58	2,04	1,14	15,44
2	-1	-1	1	40,3	34,2	79,7	53,52	9,97	1,83	3,27	1,14	16,21
3	-1	1	-1	40,3	75,8	20,3	61,33	15,71	1,95	3,25	1,54	22,45
4	-1	1	1	40,3	75,8	79,7	55,83	10,01	1,83	3,35	1,14	16,33
5	1	-1	-1	99,7	34,2	20,3	62,55	13,83	2,28	3,24	1,52	20,86
6	1	-1	1	99,7	34,2	79,7	52,80	10,76	1,78	3,48	1,17	17,20
7	1	1	-1	99,7	75,8	20,3	63,47	15,79	2,31	3,21	1,52	22,83
8	1	1	1	99,7	75,8	79,7	56,12	9,53	1,75	3,23	1,14	15,65
9	1,68	0	0	120	55	50	66,06	24,06	2,94	6,41	2,13	35,55
10	-1,68	0	0	20	55	50	60,88	23,63	1,85	6,33	2,16	33,97
11	0	-1,68	0	70	20	50	59,06	4,36	1,08	1,19	0,86	7,50
12	0	1,68	0	70	90	50	63,31	8,04	1,33	1,75	1,06	12,18
13	0	0	-1,68	70	55	0	61,59	5,95	1,25	1,64	0,97	9,82
14	0	0	1,68	70	55	100	44,82	9,56	1,64	2,95	1,03	15,18
15	-1,68	-1,68	-1,68	20	20	0	65,19	10,55	1,73	2,20	1,23	15,72
16	-1,68	-1,68	1,68	20	20	100	40,44	5,89	1,37	1,96	0,87	10,08
17	-1,68	1,68	-1,68	20	90	0	59,97	14,02	2,01	3,21	1,56	20,81
18	-1,68	1,68	1,68	20	90	100	53,96	9,90	1,60	3,09	0,56	15,15
19	1,68	-1,68	-1,68	120	20	0	65,99	2,91	1,03	1,15	0,79	5,87
20	1,68	-1,68	1,68	120	20	100	42,16	4,43	1,69	3,01	1,11	10,24
21	1,68	1,68	-1,68	120	90	0	74,03	8,97	1,54	1,98	1,11	13,60
22	1,68	1,68	1,68	120	90	100	50,83	9,15	1,53	2,86	1,00	14,54
23	0	0	0	70	55	50	61,33	21,33	2,80	5,15	2,00	31,27
24	0	0	0	70	55	50	57,47	22,34	3,00	6,45	2,13	33,92
25	0	0	0	70	55	50	58,93	22,34	2,69	5,37	1,86	32,26
26	0	0	0	70	55	50	57,47	22,60	2,73	5,45	1,94	32,73
27	0	0	0	70	55	50	58,56	21,09	2,68	5,62	1,87	31,26
28	0	0	0	70	55	50	56,64	22,63	3,09	5,98	1,94	33,65

***Rubus ulmifolius* Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos**

Tabela 11. Parte A - Resultados paramétricos da equação polinomial de segunda ordem da **Equação 3** para as respostas usadas na otimização de HAE, de acordo com o DCCC com 5 níveis (**Tabela 10**). As respostas incluem o rendimento de extração (%), o conteúdo total de antocianinas (AT, mg AT/g E) e o conteúdo individual das antocianinas detetadas (A2 a A5, em mg A/g E). A análise de significância dos parâmetros ($\alpha = 0,05$) é apresentada em valores codificados. **Parte B**- Descreve uma informação estatística do procedimento de ajuste ao modelo apresentado. **Parte C**- descreve as condições variáveis em valores naturais que levam a valores de resposta ótimos para o MSR para as respostas usadas.

		EXTRATO	CONTEÚDO INDIVIDUAL				CONTEÚDO TOTAL
		Rendimento	A2	A3	A4	A5	AT
A) Parâmetros							
Ordenada na origem	b_0	58,312±0,834	22,091±0,654	2,837±0,105	5,587±0,177	1,934±0,054	32,502±0,868
Efeito linear	b_1	0,983±0,344	-0,573±0,325	ns	ns	ns	-0,569±0,432
	b_2	1,577±0,344	1,177±0,325	0,062±0,043	0,185±0,073	0,030±0,022	1,454±0,432
	b_3	-5,182±0,344	-0,595±0,325	ns	0,215±0,073	-0,081±0,022	-0,475±0,432
Efeito quadrático	b_{11}	1,711±0,584	ns	-0,150±0,073	0,170±0,124	0,046±0,038	ns
	b_{22}	0,902±0,584	-5,938±0,539	-0,571±0,073	-1,563±0,124	-0,372±0,038	-8,458±0,715
	b_{33}	-1,918±0,584	-5,387±0,539	-0,487±0,073	-1,271±0,124	-0,358±0,038	-7,518±0,715
Efeito interativo	b_{12}	0,337±0,244	ns	ns	-0,079±0,052	ns	ns
	b_{13}	-0,712±0,244	0,371±0,231	0,039±0,031	0,107±0,052	0,058±0,016	0,576±0,306
	b_{23}	0,806±0,244	ns	-0,034±0,031	-0,053±0,052	-0,048±0,016	ns
Efeitos complexos adicionais	b_{1122}	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	b_{1133}	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	b_{2233}	-0,469±0,363	2,256±0,259	0,268±0,046	0,542±0,077	0,128±0,024	3,220±0,344
B) Informação estatística							
Estatística (R^2)		0,9336	0,9276	0,8908	0,9411	0,9294	0,9330
C) Condições variáveis ótimas para maximização da resposta							
INDIVIDUAL	Tempo	120,00±3,60	20,00±0,20	69,99±3,50	20,00±1,60	20,00±1,00	20,00±1,00
	Temperatura	90,00±9,00	57,07±0,57	56,13±2,25	57,11±4,00	56,20±3,37	56,79±1,14
	Solvente	26,97±2,16	46,62±0,93	49,94±4,49	50,34±5,03	42,42±2,12	47,14±0,94
	Resposta	72,91±5,95	23,18±2,41	2,84±0,35	6,09±0,96	2,09±0,14	33,59±3,54
GLOBAL	Tempo				20,00±0,60		
	Temperatura				56,87±3,41		
	Solvente				46,07±3,69		
	Resposta	62,08±2,34	23,18±4,51	2,42±0,24	6,06±0,85	2,08±0,44	33,58±2,97

Rubus ulmifolius Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos

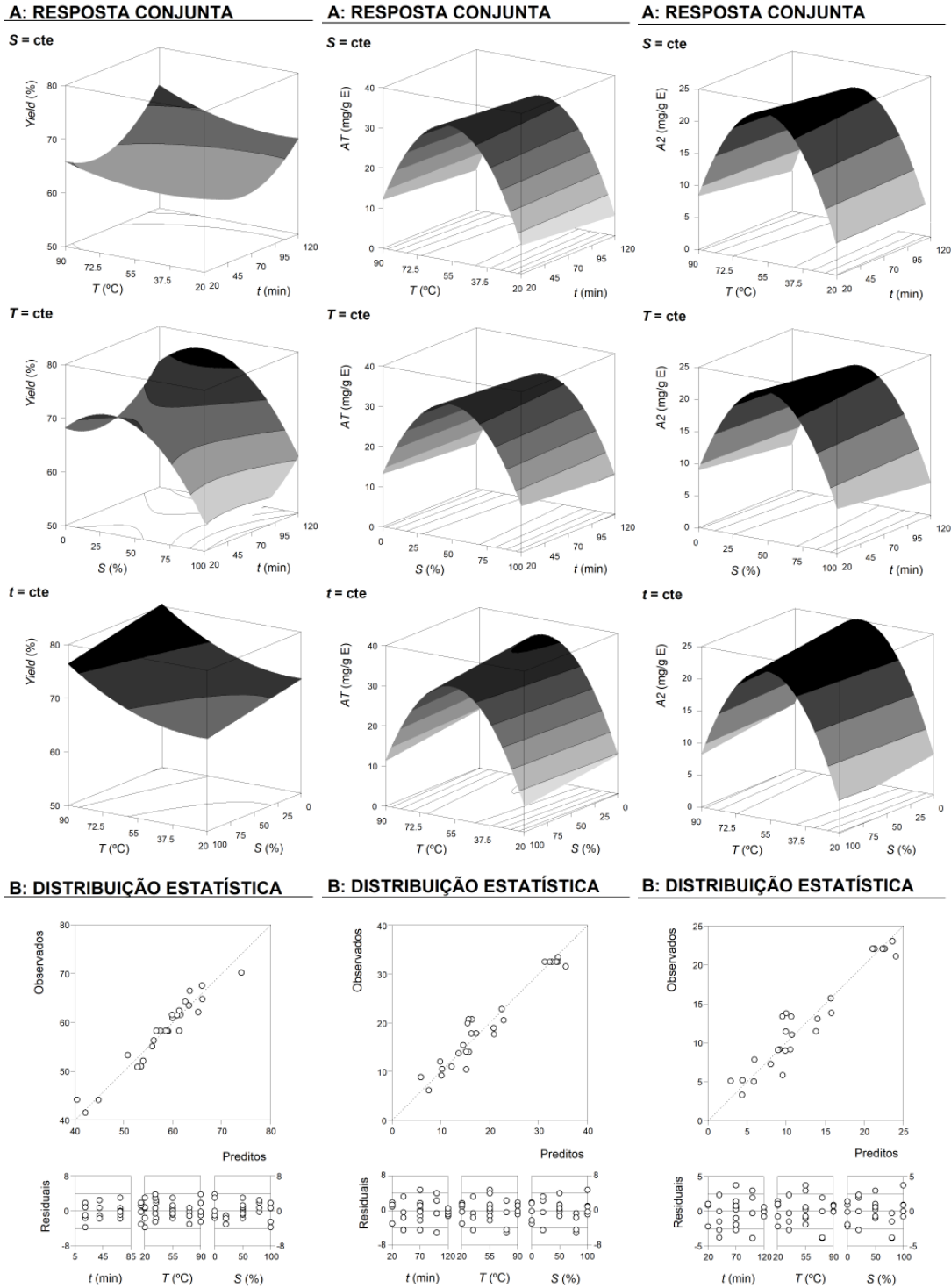


Figura 22. Ilustração dos resultados gráficos do HAE para o rendimento de extração do material obtido (%), o conteúdo total de antocianinas detetadas (AT, mg/g E) e a antocianina detetada como maioritária (A2, mg/g E). Cada figura é dividida em duas partes. **Parte A:** Ilustra a análise gráfica por superfícies de rede que representa a superfície de resposta 3D prevista com o polinómio de segunda ordem da **equação 3**. As ações binárias entre variáveis são apresentadas quando a variável excluída é posicionada no ótimo individual (**Tabela 11**). O desenho experimental e os resultados estão descritos na **Tabela 10**. **Parte B:** Ilustra a adequação do ajuste, usando dois critérios gráficos básicos de estatística. O primeiro é a capacidade de simular as alterações da resposta entre os dados previstos e observados; e o segundo, a distribuição residual em função de cada uma das variáveis.

Rubus ulmifolius Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos

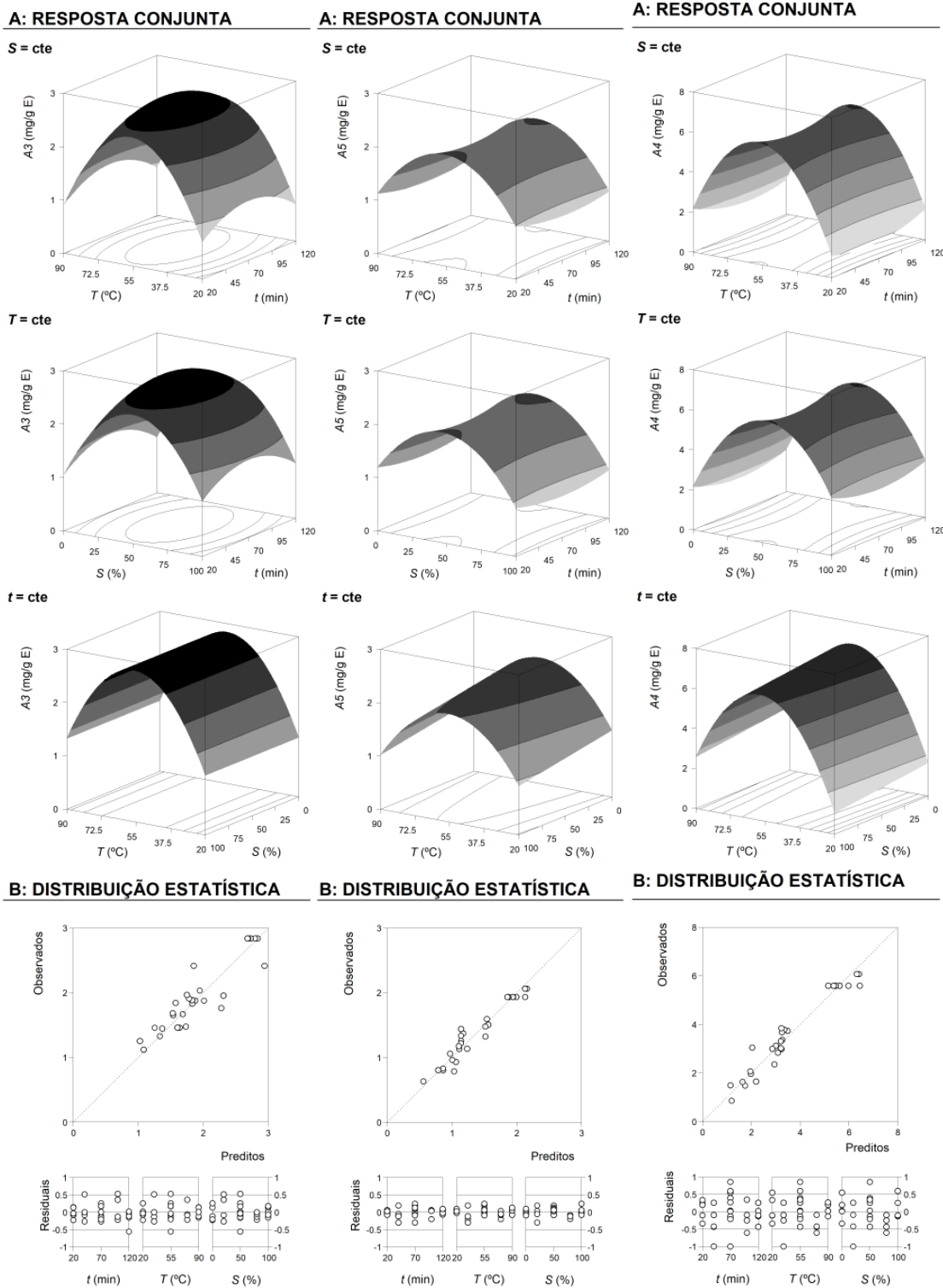


Figura 23. Ilustração dos resultados gráficos para a HAE para o conteúdo das três antocianinas detetadas em menor concentração (A3 a A5, em mg/g E). Cada figura encontra-se dividida em duas partes. Parte A: Ilustra a análise gráfica por superfícies de rede que representa a superfície de resposta 3D prevista com o polinómio de segunda ordem da equação 3. As ações binárias entre variáveis são apresentadas quando a variável excluída é posicionada no ótimo individual (Tabela 11). O desenho experimental e os resultados estão descritos na Tabela 10. Parte B: Ilustra a adequação do ajuste, usando dois critérios gráficos básicos de estatística. O primeiro é a capacidade de simular as alterações da resposta entre os dados previstos e os observados; e o segundo, a distribuição residual em função de cada uma das variáveis.

4.5.2. Condições numéricas ótimas que maximizam a extração e verificação experimental dos modelos preditivos

Com base nos resultados experimentais e análise estatística, foram ainda realizadas otimizações numéricas, com o objetivo de estabelecer o nível ótimo para as variáveis independentes com níveis de resposta pretendidos.

Com o intuito de verificar o modelo matemático utilizado no processo estudado, realizou-se uma confirmação experimental para as condições ótimas estimadas. Os resultados previstos coincidiram com os resultados experimentais, obtidos para as condições ótimas de extração, as quais foram validadas pelo modelo MSR, com uma boa correlação.

Os valores das condições variáveis que ocasionam valores de resposta ótimos para MSR, usando um desenho experimental *DCCC*, encontram-se descritos na **Tabela 11** (Parte C). Os valores mencionados foram obtidos através da combinação das informações fornecidas por todas as respostas avaliadas. Esta tabela apresenta as condições ótimas, individuais e globais, da variável e a respetiva quantidade de antocianina extraída.

Os resultados globais mostram valores de $20,00 \pm 0,60$ min, $56,87 \pm 3,41$ °C e $46,07 \pm 3,69\%$ de etanol, produzindo uma resposta de $62,08 \pm 2,34$ % de rendimento de extração, com um teor total em antocianinas de $33,58 \pm 2,97$ mg AT/g E (A2: $23,18 \pm 4,51$ mg/g E; A3: $2,42 \pm 0,24$ mg/g E; A4: $6,06 \pm 0,85$ mg/g E; e A5: $2,08 \pm 0,44$ mg/g E). Estes valores ótimos supõem um aumento de 33% na quantidade de antocianinas totais, comparativamente com os valores obtidos na extração tradicional, na qual se fazem duas extrações sucessivas ($23,7 \pm 0,1$ mg AT/g E, **Tabela 8**).

4.5.3. Análise dose-resposta do efeito da relação sólido-líquido nas condições ótimas

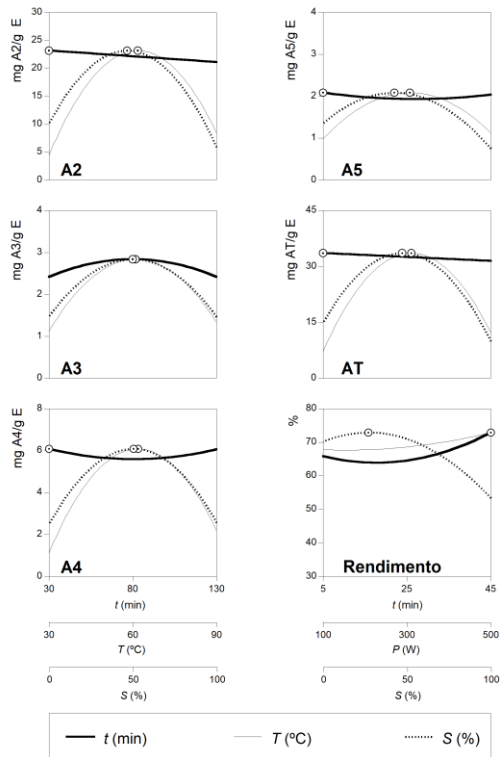
O estudo da razão *S/L* foi realizada nas condições ótimas previstas pelo modelo MSR obtido, para cada fator de resposta (**Tabela 11**). O estudo individual de *S/L* foi projetado para verificar o comportamento entre 5 a 200 g/L. O valor máximo de 200 g/L foi usado como condição limite devido à impossibilidade de produzir uma reação homogênea quando se introduzem quantidades superiores de amostra para a mesma quantidade de solvente. As respostas de dose do *S/L* obtidas foram consistentes com os resultados obtidos na análise de MSR, e poderiam ser descritas por uma relação linear simples (representada na Parte B da **figura 24**). Todos os pontos experimentais foram distribuídos em torno da equação com apenas uma variável independente e, conseqüentemente, a

resposta à dose é explicada pelo declive (m) da relação linear e ordenada na origem (b). Todos os parâmetros demonstraram valores paramétricos de m negativos, que identifica uma diminuição na capacidade de extração à medida que S/L aumenta. Portanto, a interceção (b) da equação linear representa a extração máxima atingível no menor S/L possível. As conclusões derivadas desta análise são descritas abaixo:

- Para os compostos individuais detetados, os valores lineares paramétricos foram: para A2 $b = 25,851 \pm 2,161$ mg/g E, $m = -0,051 \pm 0,009$ e $R^2 = 0,9216$; para A3 $b = 3,840 \pm 0,521$ mg/g E, $m = -0,014 \pm 0,004$ e $R^2 = 0,9434$; para A4 $b = 7,067 \pm 1,262$ mg/g E, $m = -0,022 \pm 0,011$ e $R^2 = 0,9556$; e para A5 $b = 3,107 \pm 2,161$ mg/g E, $m = -0,014 \pm 0,009$ e $R^2 = 0,9846$.
- Para o teor total dos compostos detetados ($AT = A2 + A3 + A4 + A5$), os valores paramétricos lineares foram $b = 39,864 \pm 4,334$ mg/g E, $m = -0,101 \pm 0,022$ e $R^2 = 0,9284$.
- Para o rendimento de extração (%), os valores paramétricos lineares foram: para $b = 64,606 \pm 4,178$ mg/g E, $m = -0,093 \pm 0,001$ e $R^2 = 0,9273$.

Embora nos valores mínimos (5-25 g/L) de S/L os resultados sejam semelhantes, à medida que S/L aumenta os valores relativos à capacidade de extração diminuem. Valores negativos de m mostram que o aumento de S/L leva a uma diminuição na capacidade de extração, obtendo um valor máximo de extração a 5 g/L e um mínimo a 200 g/L. No entanto, a diminuição observada é revelante, o que significa que o aumento de 1 g/L implica uma perda substancial em mg AT/g E de aproximadamente 45%, comparativamente com o extraído a 5 g/L. Em termos económicos, utilizar uma razão S/L de 200 g/L é mais vantajoso devido à maior quantidade de material extraída. No entanto, do ponto de vista da otimização, o valor ideal de S/L será de aproximadamente 25 g/L, valor a partir do qual se verifica um decréscimo na capacidade de extração.

A: Valores ótimos por RSM



B: Padrões de sólido-líquido

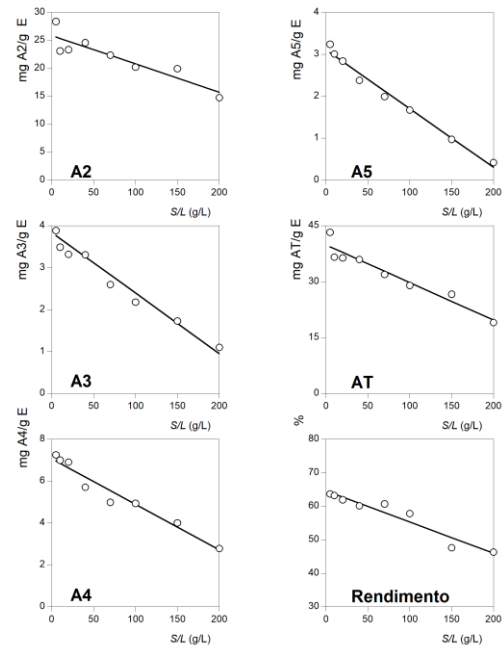



Figura 24. Resumo final dos efeitos de todas as variáveis avaliadas para o método HAE. *Parte A:* Ilustra as respostas 2D individuais de todas as respostas estudadas em função a todas as variáveis avaliadas. As variáveis em cada um dos gráficos 2D foram posicionadas nos valores ótimos individuais das restantes (**Tabela 11**). Os pontos (⊙) apresentados ao longo de cada linha, destacam a localização do valor ótimo. Linhas e pontos são gerados pelo respetivo polinómio teórico de segunda ordem derivado da **equação 3**. *Parte B:* Ilustra a dose resposta de *S/L* nos valores ótimos globais das outras três variáveis (**Tabela 11**). Os resultados experimentais são os pontos (○), enquanto as linhas são o padrão previsto por uma equação linear com ordenada na origem. O valor limite (~200 g/L) mostra a concentração experimental máxima alcançada até que a amostra não possa ser fisicamente agitada em escala laboratorial.

4.6. Potencial corante do extrato rico em antocianinas obtido a partir dos frutos de *Rubus ulmifolius*

Preparou-se o extrato de frutos de *R. ulmifolius* através da técnica de HAE conforme as condições ótimas de tempo, temperatura e concentração de solvente obtidas pelo processo de otimização (**Tabela 11**, Parte C), para posterior avaliação do potencial corante, bioativo e incorporação num produto de pastelaria. Seguindo este procedimento, a concentração total de compostos antocianicos extraídos foi de 33 ± 1 mg AT/g E, sendo um valor muito aproximado ao valor obtido pelo modelo MSR. Os parâmetros de cor do extrato foram obtidos por análise através de um colorímetro e encontram-se descritos na **Tabela 12**, conforme os valores de espaço de cor CIE L^* (luminosidade), a^* (verde/vermelho) e b^* (azul/amarelo). Os respetivos valores CIE foram convertidos em

valores RGB através de um programa (<<http://www.easyrgb.com/en/convert.php>>), onde se pode visualizar a cor obtida pelo extrato, tendo uma tonalidade vermelho-bordô.

Tabela 12. Quantidade de antocianinas no resíduo e parâmetros de cor do extrato rico em antocianinas obtido nas condições ótimas (média ± DP).

Quantificação (mg AT/g E)	<i>L</i>*	<i>a</i>*	<i>b</i>*	Cor da conversão em valores RGB
33,2 ± 0,8	24,8 ± 0,1	31,7 ± 0,5	7,6 ± 0,2	

AT- teor total de antocianinas ; *L** - luminosidade; *a** eixo cromático de verde (-) a vermelho (+); *b**, eixo cromático de azul (-) a amarelo (+).

4.7. Avaliação das propriedades bioativas do extrato rico em antocianinas obtido após otimização do processo de extração

4.7.1. Atividade citotóxica e antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do extrato rico em antocianinas foi testado e os resultados estão presentes na **Tabela 13**. Nesta avaliação verificou-se um potencial bacteriostático em todas as estirpes Gram-positivos testadas, com valores de CMI a oscilar entre 2,5 e 10 mg/mL. Por outro lado, nas estirpes Gram-negativos, apenas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii* e *Proteus mirabilis* se mostraram suscetíveis ao extrato, oscilando os valores de CMI entre 2,5 e 20 mg/mL.

Comparativamente aos resultados obtidos para o extrato de frutos de *R. ulmifolius* na secção **4.4.1.**, o extrato evidenciou uma atividade bacteriostática mais potente, nomeadamente conta as bactérias *Klebsiella pneumoniae* (CMI = 20 mg/mL para o extrato ótimo; CMI > 20 mg/mL no extrato de frutos), *Morganella morganii* (CMI = 2,5 mg/mL no extrato ótimo; CMI = 5 mg/mL no extrato do fruto) e MRSA (CMI = 2,5 mg/mL no extrato ótimo; CMI = 10 mg/mL para o extrato de fruto). O efeito bactericida obtido foi idêntico ao obtido para o extrato de frutos na secção **4.4.1.**

***Rubus ulmifolius* Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos**

Tabela 13. Resultados relativos ao potencial antimicrobiano e citotóxico do extrato rico em antocianinas obtido dos frutos de *Rubus ulmifolius* (média ± DP).

Extrato ótimo rico em antocianinas				Controlo				
Atividade Antimicrobiana (mg/mL)		Ampicilina		Imipenem		Vancomicina		
Bactérias Gram-negativos	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>Escherichia coli</i>	5	>20	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	>20	10	20	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.
<i>Morganella morganii</i>	2,5	>20	20	>20	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.
<i>Proteus mirabilis</i>	10	>20	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>20	>20	>20	>20	0,5	1	n.t.	n.t.
Bactérias Gram-positivos								
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	>20	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	<0,0078	<0,0078
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	>20	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.
MRSA	2,5	>20	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	0,25	0,5

Extrato ótimo rico em antocianinas		Controlo	
Atividade citotóxica (valores de GI ₅₀ , µg/mL)		Eliptícina	
HeLa	301 ± 19	1,91 ± 0,06	
NCI H460	337 ± 11	1,0 ± 0,1	
MCF7	328 ± 13	0,91 ± 0,04	
HepG2	286 ± 13	1,1 ± 0,2	
PLP2	>400	3,2 ± 0,7	

GI₅₀ - concentração de amostra que atinge 50% de atividade citotóxica; CMI- concentração mínima inibitória; CMB – concentração mínima bactericida.

No que concerne ao potencial citotóxico do extrato ótimo, a avaliação foi realizada em em quatro linhas celulares tumorais humanas (HepG2, NCI-H460, MCF-7 e HeLa) e numa cultura de células não-tumorais primária (PLP2) e os resultados estão igualmente apresentados na **Tabela 13**. Relativamente às linhas celulares tumorais testadas foi evidente a capacidade anti-proliferativa por parte do extrato contra todas estas, oscilando os valores de GI₅₀ entre 285,81 µg/mL na linha HepG2 e 336,54 µg/mL na linha NCI H460. Deste modo, o processo de otimização da extração e consequente aumento da concentração de compostos fenólicos presentes, levou a um maior potencial citotóxico do extrato. A nível hepatotóxico, o extrato não evidenciou qualquer citotoxicidade, obtendo-se valores de GI₅₀ > 400 µg/mL.

4.8. Estudo de incorporação num produto de pastelaria do extrato rico em antocianinas obtido dos frutos de *Rubus ulmifolius*

4.8.1. Avaliação dos parâmetros de cor, caracterização nutricional e química dos “donuts”

Considerando a importância do aspeto exterior num produto alimentar, os parâmetros de cor, nomeadamente *L** (luminosidade), *a** (intensidade da cor vermelha) e *b** (intensidade da cor amarela), foram avaliados nos “donuts” controlo e enriquecidos com

***Rubus ulmifolius* Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos**

o extrato corante. As comparações foram feitas tendo em conta a incorporação do extrato durante o tempo de armazenamento. Os resultados são apresentados na **Tabela 14**.

Tabela 14. Parâmetros de cor medidos no “donuts” controlo e incorporados com o extrato rico em antocianinas, obtido a partir dos frutos de *Rubus ulmifolius* (média ± DP).

	Controlo T0	AM_T0	p- value	Controlo T3	AM_T3	p- value	AM_T0	AM_T3	p- value
L*	76±1	57,5 ± 0,4	<0,01	77,0±0,3	57,0±0,3	<0,01	57,5±0,4	57,0±0,3	0,153
a*	-0,1±0,2	10,8 ± 0,4	<0,01	0,03±0,0	10,2±0,1	<0,01	10,8±0,4	10,2±0,1	0,007
b*	19,7±0,3	10,9 ± 0,5	<0,01	20,0±0,3	10,4±0,6	<0,01	10,9±0,5	10,4±0,6	0,081

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

Controlo_T0 – “donut” sem extrato (t=0 dias); Controlo_T3 – “donut” sem extrato (t=0 dias); AM_T0 – “donut” com extrato (t=0 dias); AM_T3 – “donut” com extrato (t=3 dias). Os resultados são expressos em média ± desvio padrão.

A medição realizada imediatamente após a confeção dos “donuts” (tempo 0 dias) revelou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em todos os parâmetros de cor avaliados (L^* , a^* , b^*), entre a amostra controlo e a amostra com extrato corante. Ao fim de 3 dias de armazenamento, foi novamente avaliada a diferença entre os dois tipos de “donuts”, referidos anteriormente, e os resultados mostraram que as diferenças de coloração prevaleceram. Relativamente aos efeitos do tempo de armazenamento na coloração dos “donuts” enriquecidos com o extrato corante, o tratamento estatístico evidenciou a preservação de cor em todos os parâmetros L^* , a^* e b^* .

As **Tabelas 15, 16 e 17** apresentam os valores médios, em g/100 g de massa fresca (mf), obtidos para a composição nutricional e química, dos “donuts” controlo e enriquecidos com o extrato ótimo rico em antocianinas dos frutos de *R. ulmifolius*. Os hidratos de carbono foram o macronutriente mais abundante com valores a oscilar entre $59,5 \pm 0,1$ e $65,2 \pm 0,1$ g/100 g mf; seguido do teor em proteínas ($6,8 \pm 0,2$ a $6,936 \pm 0,03$ g/100 g mf) e gordura ($4,6 \pm 0,1$ a $5,0 \pm 0,1$ g/100 g mf). Mais uma vez, a conteúdo de cinzas surge numa concentração bastante reduzida, com valores a oscilar entre $0,96 \pm 0,02$ e $0,97 \pm 0,02$ g/100 g mf e a humidade evidenciou valores entre $22,13 \pm 0,1$ e $28,02 \pm 0,2$ g/100 g mf. A maior parte dos hidratos de carbono está presente sob a forma de açúcares livres ($18,1 \pm 0,3$ a $19,4 \pm 0,7$ g/100 g mf), com destaque para a sacarose com valores entre $15,2 \pm 0,3$ e $17,6 \pm 0,6$ g/100 g mf. Estatisticamente apenas se verificam diferenças significativas ($p < 0,05$) nos teores de humidade, hidratos de carbono e energia, nos tempos 0 e 3 dias, entre as amostras controlo e incorporadas com o ingrediente corante. O valor energético correspondente está dentro da gama esperada para este tipo de produto, variando de $307,2 \pm 0,4$ a $332,8 \pm 0,4$ kcal/100 g mf.

***Rubus ulmifolius* Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos**

Tabela 15. Composição nutricional dos “donuts” controlo e incorporados com o extrato rico em antocianinas obtido dos frutos de *Rubus ulmifolius* (média ± DP).

	Humidade (g/100 g mf)	Proteínas (g/100 g mf)	Cinzas (g/100 g mf)	Gordura (g/100 g mf)	Hidratos de carbono (g/100 g mf)	Energia (kcal/100 g mf)
Controlo_T0	22,13 ± 0,8	6,9 ± 0,1	0,97±0,02	5,0 ± 0,1	64,91 ± 0,04	332,8 ± 0,4
AM_T0	28,02 ± 0,1	6,936 ± 0,003	0,96 ± 0,02	4,6 ± 0,1	59,5 ± 0,1	307,2 ± 0,4
<i>p-value</i>	< 0,01	0,134	0,334	0,133	< 0,01	< 0,01
Controlo_T3	22,35 ± 0,3	6,8 ± 0,2	0,97±0,02	4,7 ± 0,1	65,2 ± 0,1	330,1 ± 0,8
AM_T3	27,19 ± 0,5	6,82 ± 0,04	0,97±0,02	4,9 ± 0,1	60,10 ± 0,03	311,9 ± 0,5
<i>p-value</i>	< 0,01	0,165	0,430	0,058	< 0,01	< 0,01

Controlo_T0 – “donut” sem extrato (t=0 dias); Controlo_T3 – “donut” sem extrato (t=0 dias); AM_T0 – “donut” com extrato (t=0 dias); AM_T3 – “donut” com extrato (t=3 dias)

Relativamente ao perfil de açúcares (**Tabela 16**), destacou-se a sacarose com valores de $15,2 \pm 0,3$ a $17,6 \pm 0,6$ g/100 g mf e a trealose revelou concentrações baixas oscilando de $1,6 \pm 0,1$ a $1,92 \pm 0,04$ g/100 g mf. As moléculas de frutose a glucose foram as moléculas presentes em menor quantidade, tendo-se obtido valores abaixo de 0,7 g/100 g mf. Tendo em conta os “donuts” controlo e os “donuts” incorporados com o extrato corante, foram evidentes diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em todas as moléculas individuais de açúcares. Estas concentrações mais elevadas no “donuts” com extrato corante podem ser explicadas devido à presença de açúcares no extrato incorporado.

Tabela 16. Composição em açúcares livres dos “donuts” controlo e incorporados com o extrato rico em antocianinas obtido dos frutos de *Rubus ulmifolius* (média ± DP).

Açúcares livres	Controlo_T0	AM_T0	<i>p-value</i>	Controlo_T3	AM_T3	<i>p-value</i>
Frutose	0,07 ± 0,01	0,63 ± 0,04	<0,01	0,07 ± 0,01	0,58 ± 0,01	<0,01
Glucose	0,06 ± 0,01	0,51 ± 0,04	<0,01	0,07 ± 0,01	0,53 ± 0,04	<0,01
Sacarose	17,5 ± 0,6	16,2 ± 0,3	<0,01	17,6 ± 0,6	15,2 ± 0,3	<0,01
Trealose	1,6 ± 0,1	1,92 ± 0,04	<0,01	1,7 ± 0,1	1,78 ± 0,1	0,004
Total	19,2 ± 0,7	19,3 ± 0,2	0,619	19,4 ± 0,7	18,1 ± 0,3	<0,01

Controlo_T0 – “donut” sem extrato (t=0 dias); Controlo_T3 – “donut” sem extrato (t=0 dias); AM_T0 – “donut” com extrato (t=0 dias); AM_T3 – “donut” com extrato (t=3 dias)

Relativamente à composição em ácidos gordos (**Tabela 17**), foi obtido um perfil significativamente diferente ao obtido inicialmente aquando da caracterização química dos frutos de *R. ulmifolius*.

***Rubus ulmifolius* Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos**

Tabela 17. Composição em ácidos gordos dos “donuts” controlo e incorporados com o extrato rico em antocianinas obtido dos frutos de *Rubus ulmifolius* (média ± DP).

Ácidos gordos (%)	Controlo_T0	AM_T0	Controlo_T3	AM_T3
C6:0	0,28 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,337 ± 0,001
C8:0	0,18 ± 0,01	0,198 ± 0,004	0,179 ± 0,002	0,205 ± 0,001
C10:0	0,41 ± 0,02	0,465 ± 0,003	0,41 ± 0,01	0,482 ± 0,005
C11:0	0,019 ± 0,001	0,019 ± 0,001	0,020 ± 0,001	0,021 ± 0,001
C12:0	0,49 ± 0,02	0,585 ± 0,002	0,48 ± 0,01	0,56 ± 0,01
C13:0	0,022 ± 0,001	0,022 ± 0,001	0,019 ± 0,001	0,023 ± 0,001
C14:0	1,4 ± 0,1	1,589 ± 0,003	1,40 ± 0,01	1,61 ± 0,01
C14:1	0,12 ± 0,01	0,131 ± 0,001	0,114 ± 0,001	0,134 ± 0,001
C15:0	0,17 ± 0,01	0,183 ± 0,003	0,17 ± 0,1	0,187 ± 0,004
C16:0	10,4 ± 0,3	10,8 ± 0,1	10,39 ± 0,07	10,87 ± 0,04
C16:1	0,29 ± 0,01	0,314 ± 0,003	0,291 ± 0,001	0,312 ± 0,001
C17:0	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,130 ± 0,000	0,140 ± 0,004
C17:1	0,039 ± 0,001	0,045 ± 0,001	0,039 ± 0,001	0,045 ± 0,002
C18:1n9t	3,7 ± 0,1	3,83 ± 0,01	3,71 ± 0,02	3,76 ± 0,01
C18:1n9c	19 ± 1	18,4 ± 0,6	18,8 ± 0,5	19,25 ± 0,03
C18:2n6c	62 ± 1	60,9 ± 0,5	61,6 ± 0,3	60,0 ± 0,1
C18:3n3	0,530 ± 0,001	0,72 ± 0,01	0,508 ± 0,001	0,716 ± 0,003
C20:0	0,219 ± 0,000	0,221 ± 0,001	0,22 ± 0,01	0,219 ± 0,001
C20:1	0,158 ± 0,002	0,161 ± 0,002	0,153 ± 0,001	0,15 ± 0,01
C20:2	0,137 ± 0,001	0,135 ± 0,001	0,149 ± 0,004	0,127 ± 0,004
C20:3n3	0,024 ± 0,002	0,030 ± 0,003	0,03 ± 0,01	0,037 ± 0,001
C22:0	0,61 ± 0,01	0,589 ± 0,004	0,613 ± 0,001	0,571 ± 0,001
C24:0	0,20 ± 0,01	0,239 ± 0,003	0,27 ± 0,02	0,20 ± 0,01
SFA	14,5 ± 0,4	15,4 ± 0,1	14,6 ± 0,1	15,4 ± 0,1
MUFA	23 ± 1	22,8 ± 0,6	23,1 ± 0,4	23,66 ± 0,02
PUFA	62 ± 1	61,7 ± 0,5	62,3 ± 0,3*	60,9 ± 0,1*

Controlo_T0 – “donut” sem extrato (t=0 dias); Controlo_T3 – “donut” sem extrato (t=0 dias); AM_T0 – “donut” com extrato (t=0 dias); AM_T3 – “donut” com extrato (t=3 dias). SFA: ácidos gordos saturados; MUFA: ácidos gordos monoinsaturados; PUFA: ácidos gordos polinsaturados. Ácido caproico (C6:0); ácido caprílico (C8:0); ácido cáprico (C10:0); ácido undecanóico (C11:0); ácido dodecanóico (C12:0); ácido tridecanóico (C13:0); ácido mirístico (C14:0); ácido miristoleico (C14:1); ácido pentadecanóico (C15:0); ácido palmítico (C16:0); ácido palmitoleico (C16:1); ácido heptadecanóico (C17:0); ácido heptadecenoico (C17:1); ácido oleico-*cis* (C18:1n9c); ácido oleico-*trans* (C18:1n9t); ácido linoleico (C18:2n6); ácido α -linolénico (C18:3n3); ácido esteárico (C20:0); ácido eicosanóico (C20:1); ácido eicosadienóico (C20:2); ácido eicosatrienóico (C20:3n3); ácido beénico (C22:0); ácido lignocérico (C24:0). Os resultados apresentam-se em média ± SD desvio padrão. * Corresponde a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as duas amostras, avaliadas por um test *t*-student.

Assim, na análise dos “donuts” descrita nesta secção, não foram detetados os ácido C18:0 (ácido estearico), C21:0 (ácido heneicosanoico), C20:4n6 (ácido araquidónico), C20:5n3 (ácido eicosapentanoico) e C22:2 (ácido docosadienoico); por outro lado, foi visível a presença adicional dos ácidos C6:0 (ácido caproico), C8:0 (ácido caprílico), C10:0 (ácido caprílico), e C14:1 (ácido miristoleico), relativamente à análise realizada nos frutos. Este acréscimo em ácidos gordos pode ser explicado pelo uso de vários ingredientes ricos nos compostos lipídicos incorporadas na receita do “donuts”. Uma vez mais, na presente avaliação, salienta-se o ácido linoleico (C18:2n6c) como maioritário, oscilando os valores entre $60,0 \pm 0,1$ e $61,6 \pm 0,3$ %; e consequentemente um teor em PUFA (ácidos gordos polinsaturados) ($60,9 \pm 0,1$ e $62,2 \pm 0,3$ %) mais elevado. O tratamento estatístico foi

***Rubus ulmifolius* Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos**

efetuado para os valores totais de SFA, MUFA e PUFA e, no geral, não existem diferenças significativas ($p < 0,05$), o que seria espectável.

CONCLUSÃO

***Rubus ulmifolius* Schott: aspetos químicos, propriedades bioativas e desenvolvimento de um corante natural a partir dos seus frutos**

5. CONCLUSÃO

Os frutos da espécie *Rubus ulmifolius* Schott são muito apreciados pelos consumidores, não só pelo seu sabor, mas também derivado aos seus potenciais bioativos, que já provaram possuir diversos benefícios na saúde. O presente estudo avaliou os frutos desta espécie a nível da sua caracterização química, nutricional e potencial bioativo, e os resultados foram bastante promissores.

O perfil nutricional obtido caracteriza este fruto como sendo uma boa fonte energética, dado que os hidratos de carbono foram detetados como o macronutriente maioritário. Por sua vez, o perfil químico evidenciou como açúcar predominante a glucose, enquanto que, entre todos os ácidos orgânicos detetados, o ácido quínico apresentou a concentração mais elevada. O perfil químico evidenciado neste fruto representa o sabor doce e com uma ligeira acidez, característico da amora preta. Na avaliação de ácidos gordos, foram detetadas vinte e cinco moléculas distintas, sendo que, no geral, evidenciaram uma razão PUFA/SFA dentro dos limites considerados para garantir concentrações plasmáticas de colesterol estáveis e, conseqüentemente, prevenir doenças cardiovasculares. Além disso, os frutos revelaram a presença de todas as isoformas de tocoferóis, destacando o γ -tocopherol e o α -tocopherol, encontrados em maior concentração.

Já em termos de compostos fenólicos, as antocianinas apresentaram uma percentagem de cerca de 35% em relação ao teor total de compostos fenólicos, sendo que a cianidina-3-*O*-glucósido se apresentou como o composto predominante, seguido do pentósido e do glucurónido do ácido elágico e o sanguin H-10, respetivamente.

Por último, a avaliação da atividade antimicrobiana realizada evidenciou uma atividade bacteriostática e fungistática contra as estirpes estudadas, estando estas associadas a largos espetros de resistência; sendo, deste modo, uma matriz natural a explorar para futuras aplicações como agente antimicrobiano.

A fim de otimizar a extração de antocianinas deste fruto, para a obtenção de um ingrediente corante rico nas principais antocianinas identificadas, foi efetuado um estudo utilizando o método de superfície de resposta (MSR) a fim de maximizar todos os compostos individuais, assim com o teor total de antocianinas. A cianidina-3-*O*-glucósido (A2) foi a antocianina com o teor mais elevado de 2,91 a 24,06 mg A/g E, seguida da cianidina-3-*O*-xilósido (A4; 1,15 a 6,45 mg/g E), pelargonidina-3-*O*-glucósido (A3; 1,03 a 3,09 mg A/g E) e cianidina-3-*O*-dioxail-glucósido (A5; 0,56 a 2,16 mg/g E).

Para o processo de otimização de extração de compostos recorreu-se a uma metodologia MSR que permitiu obter as condições ótimas de extração, sendo que, de seguida, a determinação da razão sólido-líquido permitiu alcançar um processo mais rentável. Desta forma, torna-se possível a utilização de um processo convencional de extração, HAE, com resultados mais promissores. De uma forma global, o processo de otimização de extração por HAE realizado neste estudo permitiu atingir um rendimento de extração de $62,08 \pm 3,54$ %, para o qual se obteve um teor de $23,18 \pm 3,54$ mg A/g E para A2; $2,42 \pm 3,54$ mg A/g E para A3; $6,06 \pm 3,54$ mg A/g E para A4 e $2,08 \pm 3,54$ mg A/g E para A5, atingindo um teor total de antocianinas de $33,58 \pm 3,54$ mg AT/g E. Os parâmetros que ocasionaram a otimização foram tempo de $20,0 \pm 0,60$ min, temperatura de $56,87 \pm 3,41$ °C e percentagem de etanol de $46,07 \pm 3,69$ %. Neste caso, considerando o intervalo testado (5-200 g/L) e a obtenção de um valor máximo de extração a 5 g/L e um mínimo a 200 g/L, determinou-se uma relação linear decrescente até 200 g/L, e um valor ideal de *S/L* de aproximadamente 25 g/L.

O extrato obtido após otimização foi avaliado relativamente às bioatividades, sendo que evidenciou uma potencial bacteriano com valores de CMI entre 2,5 e 20 mg/mL e também um efeito anti-proliferativo em todas as linhas celulares tumorais testadas, com valores de GI_{50} entre 286 e 337 $\mu\text{g/mL}$, com ausência de toxicidade na cultura celular não tumoral testada ($GI_{50} > 400$ $\mu\text{g/mL}$).

Este ingrediente natural corante obtido dos frutos de *R. ulmifolius* revelou um grande potencial corante com uma coloração vermelho-bordô, o qual proporcionou uma coloração rosa/lilás nos “donuts”. Obtiveram-se resultados satisfatórios relativamente à preservação da cor, ao longo dos 3 dias de armazenamento testados. A ausência de alterações significativas no perfil nutricional do “donuts” após incorporação, provou que este extrato pode substituir a adição de corantes artificiais, os quais revelam evidentes riscos para a saúde pública, permitindo a confeção de produtos mais saudáveis na indústria alimentar e ainda com características organoléticas agradáveis ao consumidor.

Com base nos resultados obtidos durante este trabalho, pode-se concluir que os frutos de *R. ulmifolius* são uma ótima escolha para enriquecer a dieta diária, devido à sua composição nutricional e química. Além disso, considerando a sua composição rica em compostos antociânicos, poderá ser utilizado como uma matriz natural alternativa para obter um ingrediente corante natural.

A fim de dar continuidade a este trabalho experimental, como perspectivas futuras, seria interessante o estudo de diferentes técnicas de incorporação, do extrato rico em antocianinas, em outros produtos alimentares. Para tal, o uso de técnicas de encapsulação, tal como: microencapsulação, lipossomas, ou nanoemulsões, podem ser uma linha de investigação a seguir, na avaliação da sua estabilidade e incorporação destes compostos antociânicos.

Seria, também, pertinente a realização de estudos de mercado, com o objetivo de perceber a viabilidade deste processo a nível industrial.

6. BIBLIOGRAFIA

A

Abreu, R. M. V, Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., Lima, R. T., Vasconcelos, M. H., Adegas, F., ... Queiroz, M. J. R. P. (2011). Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-b]pyridine-2- carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(12), 5800–5806.

Akkari, H., Hajaji, S., B'chir, F., Rekik, M., & Gharbi, M. (2016). Correlation of polyphenolic content with radical-scavenging capacity and anthelmintic effects of *Rubus ulmifolius* (Rosaceae) against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 221, 46–53.

Amchova, P., Kotolova, H., & Ruda-Kucerova, J. (2015). Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73, 914–922.

Anez-Bustillos, L., Dao, D. T., Fell, G. L., Baker, M. A., Gura, K. M., Bistrrian, B. R., & Puder, M. (2018). Redefining essential fatty acids in the era of novel intravenous lipid emulsions. *Clinical Nutrition*, 37, 784–789.

Angelo, P., & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 66, 1–9.

AOAC. (2016). Official methods of analysis of AOAC International, 20th edition. *Association of Official Analytical Chemists International; Arlington; USA*.

Arici, M., Karasu, S., Baslar, M., Toker, O., Sagdic, O., & Karaagaccli, M. (2016). Tulip petal as a novel natural food colorant source: Extraction optimization and stability studies. *Industrial Crops and Products*, 91, 215–222.

Asioli, D., Aschemann-Witzel, J., Caputo, V., Vecchio, R., Annunziata, A., Næs, T., & Varela, P. (2017). Making sense of the “clean label” trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. *Food Research International*, 99, 58–71.

B

- Backes, E., Pereira, C., Barros, L., Prieto, M. A., Genena, A. K., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Recovery of bioactive anthocyanin pigments from *Ficus carica* L. peel by heat, microwave, and ultrasound based extraction techniques. *Food Research International*, *113*, 197–209.
- Bakowska-Barczak, A. (2005). Acylated Anthocyanins As Stable, Natural Food Colorants – a Review. *Polish Journal of Food And Nutrition Sciences*, *14/55*, 107–116.
- 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 and Products*, *32*, 572–579.
- Barros, L., Pereira, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Optimized Analysis of Organic Acids in Edible Mushrooms from Portugal by Ultra Fast Liquid Chromatography and Photodiode Array Detection. *Food Analytical Methods*, *6*, 309–316.
- Barros, L., Pereira, E., Calhella, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, *5*, 1732–1740.
- Barrows, J., Lipman, A., & Bailey, C. (2003). Color Additives: FDA's Regulatory Process and Historical Perspectives.
- Battestin, V., Matsuda, L. K., & Macedo, G. A. (2004). Fontes E Aplicações De Taninos E Tanases Em Alimentos. *Alimentos & Nutrição*, *15*, 63–72.
- Bessada, S. M. F., Barreira, J. C. M., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., & Oliveira, M. B. P. P. (2016). Phenolic profile and antioxidant activity of *Coleostephus myconis* (L.) Rchb.f.: An underexploited and highly disseminated species. *Industrial Crops and Products*, *89*, 45–51.
- Boer, A., & Aalt, B. (2018). Demanding safe foods – Safety testing under the novel food regulation (2015/2283). *Trends in Food Science and Technology*, *72*, 125–133.
- Branen, A., Davidson, R., Salmine, S., & Thorgate, J. (2005). *Food additives* (2nd ed.).

Bravo, L. (1998). Lead Review Article Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance, *Nutrition reviews*, 56, 317-333

Burdock, G. A., & Wang, W. (2017). Our unrequited love for natural ingredients. *Food and Chemical Toxicology*, 107, 37-46.

Burrows, A. (2009). Palette of our palates: A brief history of food coloring and its regulation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 394–408.

C

Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 377–399.

Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology*, 45, 284–295.

Cassidy, A. (2018). Berry anthocyanin intake and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, 61, 76–82.

Clifford, M. N., Knight, S., & Kuhnert, N. (2005). Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3821–3832.

Codex Alimentarius Commission - Procedural Manual. (n.d.). Retrieved December 12, 2017, from <http://www.fao.org/docrep/005/y2200e/y2200e07.htm>

Conti, B., Colzani, B., Papetti, A., Mascherpa, D., Dorati, R., Genta, I., ... Gazzani, G. (2013). Adhesive microbeads for the targeting delivery of anticaries agents of vegetable origin. *Food Chemistry*, 138, 898–904.

D

D'Agostino, M. F., Sanz, J., Sanz, M. L., Giuffrè, A. M., Sicari, V., & Soria, A. C. (2015). Optimization of a Solid-Phase Microextraction method for the Gas Chromatography-Mass Spectrometry analysis of blackberry (*Rubus ulmifolius* Schott) fruit volatiles. *Food Chemistry*, 178, 10–17.

- Dai, J., Gupte, A., Gates, L., & Mumper, R. J. (2009). A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, *47*, 837–847.
- Dall'Acqua, S., Cervellati, R., Loi, M. C., & Innocenti, G. (2008). Evaluation of in vitro antioxidant properties of some traditional Sardinian medicinal plants: Investigation of the high antioxidant capacity of *Rubus ulmifolius*. *Food Chemistry*, *106*, 745–749.
- De Araújo Siqueira Bento, W., Lima, B. P., & Paim, A. P. S. (2015). Simultaneous determination of synthetic colorants in yogurt by HPLC. *Food Chemistry*, *183*, 154–160.
- Deighton, N., Brennan, R., Finn, C., & Davies, H. V. (2000). Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*, 1307–1313.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). *Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *40*, 173-289.
- Devcich, D. A., Pedersen, I. K., & Petrie, K. J. (2007). You eat what you are: Modern health worries and the acceptance of natural and synthetic additives in functional foods. *Appetite*, *48*, 333–337.
- Dias, M. I., Barros, L., Sousa, M. J., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Nutracêuticos e potencial antioxidante de erva-cidreira : amostras cultivadas , obtidas por cultura in vitro e comerciais, 8–12.
- Dickson-Spillmann, M., Siegrist, M., & Keller, C. (2011). Attitudes toward chemicals are associated with preference for natural food. *Food Quality and Preference*, *22*, 149–156.
- Ding, M., Feng, R., Wang, S. Y., Bowman, L., Lu, Y., Qian, Y., ... Shi, X. (2006). Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *Journal of Biological Chemistry*, *281*, 17359–17368.
- Durge, A. V., Sarkar, S., & Singhal, R. S. (2013). Stability of anthocyanins as pre-extrusion colouring of rice extrudates. *Food Research International*, *50*, 641–646.

E

Elagizi, A., Lavie, C. J., Marshall, K., DiNicolantonio, J. J., O’Keefe, J. H., & Milani, R. V. (2018). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Health: A Comprehensive Review. *Progress in Cardiovascular Diseases*.

Emilia, M., & Accame, C. (2016). Frutos Con Interés En Farmacia : Grosellas, 39, 1044-1046.

European Parliament and Council. (2011). Commission Regulation (EU) N° 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) N° 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives. *Official Journal of the European Union*, 295, 1–177.

F

FAO, & WHO. (2014). Guidelines for the simple evaluation of dietary exposure to food additives CAC/GL 3-1989 Adopted 1989. Revision 2014 (formerly Guidelines for the Simple Evaluation of Food Additive Intake), 2014, 1–12.

Fazio, A., Plastina, P., Meijerink, J., Witkamp, R. F., & Gabriele, B. (2013). Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy: Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. *Food Chemistry*, 140, 817–824.

Flamini, G., Catalano, S., Caponi, C., Panizzi, L., & Morelli, I. (2002). Three anthrones from *Rubus ulmifolius*. *Phytochemistry*, 59, 873–876.

G

Giada, M. (2013). World ’ s largest Science , Technology & Medicine Open Access book publisher Food Phenolic Compounds : Main Classes , Sources and Their Antioxidant Power. *Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power*.

Gomes, F., Martins, N., Barros, L., Rodrigues, M. E., Oliveira, M. B. P. P., Henriques, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Plant phenolic extracts as an effective strategy to control *Staphylococcus aureus*, the dairy industry pathogen. *Industrial Crops and Products*, 112, 515–520.

Gonçalves, G. A., Soares, A. A., Correa, R. C. G., Barros, L., Haminiuk, C. W. I., Peralta, R. M., ... Bracht, A. (2017). Merlot grape pomace hydroalcoholic extract improves the oxidative and inflammatory states of rats with adjuvant-induced arthritis. *Journal of Functional Foods*, 33, 408–418.

González, J. A., García-Barriuso, M., & Amich, F. (2010). Ethnobotanical study of medicinal plants traditionally used in the Arribes del Duero, western Spain. *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 343–355.

Govindan, K. (2018). Sustainable consumption and production in the food supply chain: A conceptual framework. *International Journal of Production Economics*, 195, 419–431.

Gras, C. C., Nemetz, N., Carle, R., & Schweiggert, R. M. (2017). Anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and their color modulation by the addition of phenolic acids and food-grade phenolic plant extracts. *Food Chemistry*, 235, 265–274.

H

Hajaji, S., Jabri, M. A., Sifaoui, I., López-Arencibia, A., Reyes-Batlle, M., B'chir, F., ... Akkari, H. (2017). Amoebicidal, antimicrobial and in vitro ROS scavenging activities of Tunisian *Rubus ulmifolius* Schott, methanolic extract. *Experimental Parasitology*, 183, 224–230.

Heleno, S. A., Prieto, M. A., Barros, L., Rodrigues, A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Optimization of microwave-assisted extraction of ergosterol from *Agaricus bisporus* L. by-products using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology*, 100, 25–35.

Herbst, W., & Hunger, K. (2006). *Industrial Organic Pigments*.

Hutchings, J. (1994). *Food Colour and Appearance*.

J

Jiménez L., C., Caleja, C., Prieto, M. A., Barreiro, M. F., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Optimization and comparison of heat and ultrasound assisted extraction techniques to obtain anthocyanin compounds from *Arbutus unedo* L. fruits. *Food Chemistry*, 264, 81–91.

Joaquín-Cruz, E., Dueñas, M., García-Cruz, L., Salinas-Moreno, Y., Santos-Buelga, C., & García-Salinas, C. (2015). Anthocyanin and phenolic characterization, chemical composition and antioxidant activity of chagalapoli (*Ardisia compressa* K.) fruit: A tropical source of natural pigments. *Food Research International*, *70*, 151–157.

K

Kaume, L., Gilbert, W. C., Brownmiller, C., Howard, L. R., & Devareddy, L. (2012). Cyanidin 3-O- β -d-glucoside-rich blackberries modulate hepatic gene expression, and anti-obesity effects in ovariectomized rats. *Journal of Functional Foods*, *4*, 480–488.

Kaume, L., Howard, L. R., & Devareddy, L. (2012). The blackberry fruit: A review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 5716–5727.

Kemperman, R. A., Bolca, S., Roger, L. C., & Vaughan, E. E. (2010). Novel approaches for analysing gut microbes and dietary polyphenols: Challenges and opportunities. *Microbiology*, *156*, 3224–3231.

Kim, E. K., & Choi, E. J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1802*, 396–405.

Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, *64*, 923–933.

L

Lewis, R. (1989). *Food Additives Handbook*, 592.

Lin, W.-S., He, P. H., Chau, C.-F., Liou, B.-K., Li, S., & Pan, M.-H. (2018). The feasibility study of natural pigments as food colorants and seasonings pigments safety on dried tofu coloring. *Food Science and Human Wellness*, *7*, 220–228

López, C. J., Caleja, C., Prieto, M. A., Barreiro, M. F., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Optimization and comparison of heat and ultrasound assisted extraction techniques to obtain anthocyanin compounds from *Arbutus unedo* L. Fruits. *Food Chemistry*, *264*, 81–91.

Lorenzo, J. M., Pateiro, M., Domínguez, R., Barba, F. J., Putnik, P., Kovačević, D. B., ... Franco, D. (2017). Berries extracts as natural antioxidants in meat products: A review. *Food Research International*, 106, 1096-1104.

M

Maksimovic, V., Nikolic, M., Bogdanovic, J., Maletic, R., Milatovic, D., & Milivojevic, J. (2011). Chemical and Antioxidant Properties of Cultivated. *Journal of Food Quality*, 34, 1–9.

Mapari, S. A. S., Thrane, U., & Meyer, A. S. (2010). Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants?. *Trends in Biotechnology*, 28, 300–307.

Markakis, P. (2012). Anthocyanins as Food Colors, *Academic Press*, 263

Marrubini, G., Appelblad, P., Gazzani, G., & Papetti, A. (2015). Determination of free quinic acid in food matrices by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography with UV detection. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44, 80–85.

Martins, A., Barros, L., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Fernandes, I. P., Barreiro, F., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Phenolic extracts of *Rubus ulmifolius* Schott flowers: characterization, microencapsulation and incorporation into yogurts as nutraceutical sources. *Food Funct.*, 5, 1091–1100.

Martins, N., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Mountain food products: A broad spectrum of market potential to be exploited. *Trends in Food Science and Technology*, 67, 12–18.

Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science and Technology*, 52, 1–15.

McDougall, G. J., Martinussen, I., Junttila, O., Verrall, S., & Stewart, D. (2011). Assessing the influence of genotype and temperature on polyphenol composition in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) using a novel mass spectrometric method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 10860–10868.

Mojica, L., Berhow, M., & Gonzalez de Mejia, E. (2017). Black bean anthocyanin-rich extracts as food colorants: Physicochemical stability and antidiabetes potential. *Food Chemistry*, 229, 628–639.

Montesano, D., Fallarino, F., Cossignani, L., Bosi, A., Simonetti, M. S., Puccetti, P., & Damiani, P. (2008). Innovative extraction procedure for obtaining high pure lycopene from tomato. *European Food Research and Technology*, 226, 327–335.

Moragues-Faus, A., Sonnino, R., & Marsden, T. (2017). Exploring European food system vulnerabilities: Towards integrated food security governance. *Environmental Science and Policy*, 75, 184–215.

Morales, P., Ferreira, I. C. F. R., Carvalho, A. M., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M. S. O. S. C. C., Cámara, M., ... Tardío, J. (2013). Wild edible fruits as a potential source of phytochemicals with capacity to inhibit lipid peroxidation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 176–185.

Morales, P., & Sánchez-mata, M. C. (2015). Revalorización de frutos silvestres de uso tradicional en España , *Arbutus unedo* L ., *Crataegus monogyna* Jacq ., *Prunus spinosa* L . y *Rubus ulmifolius* Schott, 107–112.

Moscato, E. M., & Machin, J. E. (2018). Mother natural: Motivations and associations for consuming natural foods. *Appetite*, 121, 18–28.

Moubarac, J. C., Batal, M., Louzada, M. L., Martinez Steele, E., & Monteiro, C. A. (2017). Consumption of ultra-processed foods predicts diet quality in Canada. *Appetite*, 108, 512–520.

Msagati, J. (2012). *The Chemistry of Food Additives and Preservatives*, 67.

Munawar, N., & Jamil, H. M. T. bt H. (2014). The Islamic Perspective Approach on Plant Pigments as Natural Food Colourants. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 121, 193–203.

Murado García, M. A., & Prieto Lage, M. Á. (2013). Dose-Response Analysis in the Joint Action of Two Effectors. A New Approach to Simulation, Identification and Modelling of Some Basic Interactions. *PLoS ONE*, 8.

N

Nadeem, N., Woodside, J. V., Kelly, S., Allister, R., Young, I. S., & McEneny, J. (2012). The two faces of α - and γ -tocopherols: An in vitro and ex vivo investigation into VLDL, LDL and HDL oxidation. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23, 845–851.

Neri-Numa, I. A., Pessoa, M. G., Paulino, B. N., & Pastore, G. M. (2017). Genipin: A natural blue pigment for food and health purposes. *Trends in Food Science and Technology*, *67*, 271–279.

Nielsen. (2015). We are what we eat: Healthy eating trends around the world, 1–27.

O

Oludemi, T., Barros, L., Prieto, M. A., Heleno, S. A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Extraction of triterpenoids and phenolic compounds from: *Ganoderma lucidum*: Optimization study using the response surface methodology. *Food and Function*, *9*.

Ospina-E, J. C., Sierra-C, A., Ochoa, O., Pérez-Álvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2012). Substitution of saturated fat in processed meat products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *52*, 113–122.

Oszmiański, J., Nowicka, P., Teleszko, M., Wojdyło, A., Cebulak, T., & Oklejewicz, K. (2015). Analysis of phenolic compounds and antioxidant activity in wild blackberry fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*, 14540–14553.

Overview of Food Ingredients, Additives & Colors. (n.d.).

Özcan, M. (2004). Mineral contents of some plants used as condiments in Turkey. *Food Chemistry*, *84*, 437–440.

P

Panizzi, L., Caponi, C., Catalano, S., Cioni, P. L., & Morelli, I. (2002). In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*, *79*, 165–168.

Papetti, A., Mascherpa, D., Carazzone, C., Stauder, M., Spratt, D. A., Wilson, M., ... Gazzani, G. (2013). Identification of organic acids in *Cichorium intybus* inhibiting virulence-related properties of oral pathogenic bacteria. *Food Chemistry*, *138*, 1706–1712.

Pereira, C., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Plantas aromáticas usadas como condimentos: prevalência de ácidos gordos polinsaturados.

- Pereira, E., Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats. *Food Chemistry*, *130*, 394–403.
- Pinela, J., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Wild edible plants: Nutritional and toxicological characteristics, retrieval strategies and importance for today's society. *Food and Chemical Toxicology*, *110*, 165–188.
- Pinela, J., Prieto, M. A., Carvalho, A. M., Barreiro, M. F., Oliveira, M. B. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Microwave-assisted extraction of phenolic acids and flavonoids and production of antioxidant ingredients from tomato: A nutraceutical-oriented optimization study. *Separation and Purification Technology*, *164*, 114–124.
- Pinela, J., Prieto, M. A., Pereira, E., Jabeur, I., Barreiro, M. F., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Optimization of heat- and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* calyces for natural food colorants. *Food Chemistry*, *275*, 309–321.
- Pires, T. C. S. P., Dias, M. I., Barros, L., Calhelha, R. C., José, M., Oliveira, M. B. P. P., ... Ferreira, I. C. F. R. (2018). Edible flowers as sources of phenolic compounds with bioactive potential. *Food Research International*, *105*, 580–588.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuş, V., Olah, N. K., & Mathe, E. (2018). An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *143*, 922–935.
- Popkin, B. M., & Kenan, W. R. (2016). Preventing type 2 diabetes: Changing the food industry. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, *30*, 373–383.
- Prado, M., & Godoy, H. (2003). Corantes artificiais em alimentos. *Brazilian Journal of Food and Nutrition*, *14*, 237–250.
- Prieto, M. A., & Vázquez, J. A. (2014). In vitro determination of the lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of unroasted coffee bean extracts and their synergistic and antagonistic effects. *Food Research International*, *62*, 1183–1196.

Q

Quave, C. L., Estévez-Carmona, M., Compadre, C. M., Hobby, G., Hendrickson, H., Beenken, K. E., & Smeltzer, M. S. (2012). Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics, 7.

R

Reidel, R., Melai, B., Cioni, P., Flamini, G., & Pistelli, L. (2016). Aroma Profile of *Rubus ulmifolius* Flowers and Fruits During Different Ontogenetic Phases. *Chemistry and Biodiversity*, 13, 1776–1784.

Rincón-Cervera, M. Á., González-Barriga, V., Valenzuela, R., López-Arana, S., Romero, J., & Valenzuela, A. (2019). Profile and distribution of fatty acids in edible parts of commonly consumed marine fishes in Chile. *Food Chemistry*, 274, 123–129.

Rodrigues, S., Calhella, R. C., Barreira, J. C. M., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Abreu, R. M. V., ... Ferreira, I. C. F. R. (2012). *Crataegus monogyna* buds and fruits phenolic extracts: Growth inhibitory activity on human tumor cell lines and chemical characterization by HPLC-DAD-ESI/MS. *Food Research International*, 49, 516–523.

Rodríguez-Amaya, D. B. (2016). Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science*, 7, 20–26.

Rodríguez-Amaya, D. B. (2018). Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. *Food Research International*, 1–6.

Rodríguez-Roque, M. J., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2015). Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. *Journal of Functional Foods*, 14, 33–43.

Román, S., Sánchez-Siles, L. M., & Siegrist, M. (2017). The importance of food naturalness for consumers: Results of a systematic review. *Trends in Food Science and Technology*, 67, 44–57.

Roriz, C. L., Barros, L., Prieto, M. A., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Floral parts of *Gomphrena globosa* L. as a novel alternative source of betacyanins: Optimization of the extraction using response surface methodology. *Food Chemistry*, 229, 223–234.

Ruiz-Rodríguez, B. M., Sánchez-Moreno, C., De Ancos, B., Cortes Sánchez-Mata, M. de, Fernández-Ruiz, V., Cámara, M., & Tardío, J. (2014). Wild *Arbutus unedo* L. and *Rubus ulmifolius* Schott fruits are underutilized sources of valuable bioactive compounds with antioxidant capacity. *Fruits*, *69*, 435–448.

S

Sadowski, A., & Baer-Nawrocka, A. (2018). Food and environmental function in world agriculture—Interdependence or competition? *Land Use Policy*, *71*, 578–583.

Saltmarch, M. (2013). *Essential Guide to Food Additives*.

Sánchez-Mata, M., & Tardío, J. (2016). Mediterranean wild edible plants.

Sharma, D. (2014). Understanding Biocolour- A Review. *International Journal of Scientific and Technology Research*, *3*, 294–299.

Shiozer, A. L., & Barata, L. E. S. (2007). Estabilidade de Corantes e Pigmentos de Origem Vegetal. *Revista Fitos*, *3*, 6–24.

Sisti, M., De Santi, M., Fraternali, D., Ninfali, P., Scoccianti, V., & Brandi, G. (2008). Antifungal activity of *Rubus ulmifolius* Schott standardized in vitro culture. *LWT - Food Science and Technology*, *41*, 946–950.

Sousa, M. B., Ramos, A. C., & Serrano, C. (2016). *Amoras silvestres* : Caracterização dos frutos, *26*, 269–277.

Spence, C. (2015). On the psychological impact of food colour. *Flavour*, *4*, 21.

Sun, F., DAI, Y., & Yu, X. (2017). Air pollution, food production and food security: A review from the perspective of food system. *Journal of Integrative Agriculture*, *16*, 2945–2962.

T

Tallima, H., & El Ridi, R. (2018). Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits – A review. *Journal of Advanced Research*, *11*, 33–41.

Tan, J. B. L., Lim, Y. Y., & Lee, S. M. (2014). *Rhoeo spathacea* (Swartz) Stearn leaves, a potential natural food colorant. *Journal of Functional Foods*, *7*, 443–451.

Tang, B., Xi, C., Zou, Y., Wang, G., Li, X., Zhang, L., ... Zhang, J. (2014). Simultaneous determination of 16 synthetic colorants in hotpot condiment by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 960, 87–91.

Tavares, L., Figueira, I., MacEdo, D., McDougall, G. J., Leitão, M. C., Vieira, H. L. A., ... Santos, C. N. (2012). Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 131, 1443–1452.

U

Ugaz, O. (1997). *Colorantes Naturales*. Peru.

Upadhyay, S. K., & Pandey, R. M. (2012). *Food additive*. (Y. El-Samragy, Ed.), *Food additive*. In Tech.

V

Vieira, V., Prieto, M. A., Barros, L., Coutinho, J. A. P., Ferreira, O., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Optimization and comparison of maceration and microwave extraction systems for the production of phenolic compounds from *Juglans regia* L. for the valorization of walnut leaves. *Industrial Crops and Products*, 107, 341–352.

W

Wadhwa, D., & Capaldi-Phillips, E. D. (2014). A review of visual cues associated with food on food acceptance and consumption. *Eating Behaviors*, 15, 132-143.

Wang, S. Y., Bowman, L., & Ding, M. (2008). Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells. *Food Chemistry*, 107, 1261–1269.

Wang, S. Y., & Lin, H. S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 140–146.

Wang, W., Jung, J., Tomasino, E., & Zhao, Y. (2016). Optimization of solvent and ultrasound-assisted extraction for different anthocyanin rich fruit and their effects on anthocyanin compositions. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 229–238.

Wang, X., Wu, Y., Chen, G., Yue, W., Liang, Q., & Wu, Q. (2013). Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganii rhizoma* with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 846–854.

Winger, R., & Wall, G. (2006). Food product innovation - a background paper, 26.

Wong, D. (1998). *Química de los alimentos: Mecanismos y teoría*.

World Health Organization. (n.d.).

Wrolstad, R. E., & Culver, C. A. (2012). Alternatives to Those Artificial FD&C Food Colorants. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 59–77.

X

Xie, L., Su, H., Sun, C., Zheng, X., & Chen, W. (2018). Recent advances in understanding the anti-obesity activity of anthocyanins and their biosynthesis in microorganisms. *Trends in Food Science and Technology*, 72, 13–24.

Z

Zhang, N., Ju, Z., & Zuo, T. (2018). Time for food: The impact of diet on gut microbiota and human health. *Nutrition*, 51–52, 80–85.

Zhu, Z., He, J., Liu, G., Barba, F. J., Koubaa, M., Ding, L., ... Vorobiev, E. (2016). Recent insights for the green recovery of inulin from plant food materials using non-conventional extraction technologies: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, 1–9.