

**Doutoramento**  
Ciências do Consumo Alimentar e Nutrição

# **Efeito dos processos de confeção no teor de antocianinas**

Tânia Cristina de Jesus Cordeiro

**D**

2019



**Doutoramento em Ciências do Consumo Alimentar e Nutrição**  
**Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto**  
**Faculdade de Ciências da Universidade do Porto**

**EFEITO DOS PROCESSOS DE CONFEÇÃO NO TEOR DE ANTOCIANINAS**

Tânia Cristina de Jesus Cordeiro

Janeiro 2019

Orientação:

Prof.<sup>a</sup> Doutora Conceição Calhau

Prof. Doutor Nuno Mateus

Prof.<sup>a</sup> Doutora Olívia Pinho

## **CONTRIBUTO PESSOAL NOS TRABALHOS DE INVESTIGAÇÃO APRESENTADOS NESTA DISSERTAÇÃO**

A candidata declara que contribuiu de forma determinante na concretização do trabalho experimental, desde a programação à execução do trabalho experimental. A candidata contribuiu na interpretação e discussão dos resultados apresentados em todos os artigos desta dissertação, bem como na redação dos mesmos.

O trabalho experimental deste trabalho foi executado no Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, no Laboratório de Bromatologia e Hidrologia do Departamento de Ciências Químicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, na Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto e na empresa Mendes e Gonçalves e Filhos LDA.



*“Knowing is not enough; we must apply. Willing is not enough; we must do.”*

By Goethe



# AGRADECIMENTOS

Esta dissertação dedico-o às duas pessoas decisivas no meu percurso enquanto pessoa e profissional, porque sem eles não teria conquistado o que conquistei ao longo de toda a minha vida, **Mãe e Pai**.

Ao longo deste tempo tive o prazer de ter pessoas que partilharam comigo este percurso, às vezes sinuoso, outras vezes plano, que viveram comigo as minhas angústias, mas também as minhas vitórias, e por isso, apenas poderei expressar o meu profundo agradecimento por terem estado lá.

Em especial:

aos meus orientadores, **Prof. Conceição, Prof. Nuno e Prof. Olívia**, agradeço por todos os ensinamentos e orientação, por terem acreditado em mim e pelas oportunidades que me deram que fizeram com que este trabalho se pudesse concretizar;

à **Iva** e à **Olga** agradeço por tudo, não consigo expressar o quanto vos estou agradecida, sem vocês não teria sido possível;

à **Xana** por estar sempre presente nos momentos bons e nos menos bons, por me apoiar e me aconselhar, por me ter dado oportunidade de crescer enquanto pessoa e profissional, e por fazer parte da minha vida, obrigada;

à **Carla, Bárbara, Sofia, Isa, Georgina, Helena, Anita, Filipa, Luís, Rui e Delphine**, obrigada por me acompanharem ao longo destes anos, por me apoiarem e estarem sempre lá;

à **Beatriz, Clara, Nair**, mas também à **Paula, Rosa, Rui e Sónia**, por suportarem o meu mau feitio ao longo de todo este processo e por sempre me terem apoiado e motivado a continuar;

ao meu irmão, **Pedro**, por ser o artista que me acompanha;

à **Mendes e Gonçalves e Filhos LDA**. por desde a primeira hora apoiar este projeto;

à **Cherry** por estar sempre para me mimar;

ao **Miguel** por me acompanhar, por me apoiar, por me ajudar a abrir as portas dos meus sonhos. O meu companheiro que partilha comigo os meus sucessos e as minhas angústias e a sua preciosa perceção numa área que desconhecia mas que fez tudo para compreender.





## ABSTRACT

The gastronomic tradition strongly marks the Portuguese culture, demonstrated by the richness of its traditional recipes. Cooking is the process in which confection methods that promote changes in food are applied. Epidemiological data demonstrate a strong evidence of the protective role of the consumption of small fruits, red fruits, relative to different pathologies (cancer, cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases, diabetes, among others), mainly by the presence of anthocyanins. The knowledge of factors modulating the bioavailability of these compounds is of high nutritional and food importance. However, data on the impact of culinary processing in the anthocyanin content are scarce.

This work had as objectives: (i) to evaluate the impact of different culinary techniques and culinary recipes on anthocyanin content; (ii) to develop a seasoning based on elderberry for use in traditional Portuguese cuisine, a vinegar, (iii) evaluate the impact of industrial processing on anthocyanin content and (iv) to understand the potential effect of the application of this seasoning on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). For the accomplishment of the objectives the red fruits, raspberry and elderberry were first selected, due to the profile of anthocyanins, then the culinary processes were chosen that traditionally are used for cooking of desserts (boiling, steaming and baking), and selected dessert recipes were chosen from those that could exemplify previously selected culinary methods, compote, muffin, crumble and mousse. For the development of elderberry vinegar was selected the technique of industrial vinegar production used by the company that developed the same, submerged fermentation. Finally, the traditional method of seasoning and subsequent confection of pork loin using a disposable charcoal barbecue was selected for the last objective. For the analytical study of the anthocyanin quantification, a high performance liquid chromatography (HPLC) analysis with a diode array detector (DAD) was use and for the quantification of PAHs was use HPLC with fluorescence detection.

Our results showed that cooking berries decrease (appx 20%) anthocyanin content that was a heating process-independent. On the other hand, berries incorporated in the recipes, showed a decrease in the anthocyanin content that was more pronounced in the jam > muffin > crumble > mousse.

After the development of the anthocyanin-rich seasoning, vinegar, it was verified that the four anthocyanins identified in the initial elderberry substrate were kept in the prepared after the alcoholic fermentation and after the acetic fermentation. After the alcoholic fermentation, the anthocyanin content was increased and on the other hand, after the acetic fermentation the anthocyanin content was lost.

Finally, the impact of the use of vinegar as a seasoning on pork when grilled in the formation of PAHs was analyzed. Thus, elderberry vinegar had the highest inhibitory effect on PAHs formation (82%), followed by white wine vinegar (79%), red wine vinegar and cider vinegar (66%, both) and fruit vinegar with raspberry juice (55%).

The results of the first study first show that the recipe matrix and the type of domestic cooking method may negatively affect the stability and accessibility of anthocyanins in fresh fruits and that the incorporation of berries into uncooked recipes such as mousse may be the best way to preserve its anthocyanin content. As regards the second study, it was found that elderberries may be a good choice for the production of a new seasoning, vinegar, and that this may be a source of excellence in anthocyanins and that can be used in cooking . Finally, the third study can demonstrate that using vinegars as a meat seasoning makes it possible to reduce the formation of PAH in charcoal grilled pork, so that the use of seasoning with a vinegar rich in phenolic compounds, especially anthocyanins, should be encouraged to reduce exposure to those compounds with carcinogenic potential.

**Keywords:** recipes, domestic cooking, culinary, raspberry, elderberry, vinegar, PAHs, anthocyanin

## RESUMO

A tradição gastronómica marca fortemente a cultura portuguesa, demonstrado pela riqueza do seu receituário tradicional. Cozinhar é o processo no qual se aplicam métodos de confeção que promovem alterações nos alimentos. Dados epidemiológicos apontam para uma forte evidência do papel protetor do consumo de pequenos frutos, frutos vermelhos, relativamente a diferentes patologias (cancro, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, diabetes, entre outras), sobretudo pela presença de antocianinas. O conhecimento de fatores moduladores da biodisponibilidade destes compostos é de elevada importância nutricional e alimentar. No entanto, os dados sobre o impacto de processamento culinário na biodisponibilidade destes compostos são escassos.

Este trabalho teve como objetivos: (i) avaliar o impacto de diferentes técnicas e receitas culinárias no teor de antocianinas; (ii) desenvolver um tempero à base de baga de sabugueiro para utilização na culinária tradicional portuguesa, um vinagre, (iii) conhecer o impacto do processamento industrial no teor de antocianinas e (iv) compreender o potencial efeito da aplicação deste tempero nos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs). Para a concretização dos objetivos, primeiramente selecionaram-se os frutos vermelhos, framboesa e a baga de sabugueiro, devido ao perfil de antocianinas, de seguida escolheram-se os processos culinários que tradicionalmente são utilizados para confeção de sobremesas (cozer, cozer ao vapor e assar), e selecionaram-se receitas tipificadas de sobremesas escolhendo aquelas que poderiam exemplificar os métodos de culinária selecionados anteriormente, compota, queque, crumble e mousse. Para o desenvolvimento do vinagre de baga de sabugueiro foi selecionada a técnica de produção de vinagre industrial utilizada pela empresa que desenvolveu o mesmo, usando a fermentação submersa. Para compreender a influência das antocianinas do vinagre de baga de sabugueiro na formação dos PAHs, usou-se carne do lombo de porco grelhado em carvão. Para o estudo analítico da quantificação das antocianinas foi realizada a análise por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) com um detetor de matriz de diodo (DAD). A quantificação dos PAHs foi realizada por HPLC com deteção por fluorescência.

Os nossos resultados demonstraram que cozinhar as bagas diminui (aprox. 20%) o teor de antocianinas sendo independente da temperatura. Por outro lado, incorporar as bagas em receitas evidenciou uma diminuição do teor de antocianinas sendo mais pronunciado na compota > queque > crumble > mousse.

Após o desenvolvimento do tempero ácido rico em antocianinas, o vinagre, verificou-se que as quatro antocianinas identificadas no substrato inicial de baga de sabugueiro se mantiveram nos preparados após a fermentação alcoólica e após a fermentação acética, e que o teor de antocianinas reduziu face ao produto inicial.

Por fim, foi analisado o impacto da utilização do vinagre como tempero em carne de porco quando grelhada em carvão na formação de PAHs. Assim, o vinagre de baga sabugueiro apresentou o maior efeito inibitório na formação da PAH4 (82%), seguido do vinagre de vinho branco (79%), vinagre de vinho tinto e vinagre de cidra (66%) e vinagre de fruta com sumo de framboesa (55%).

Os resultados do primeiro estudo mostram primeiramente que a matriz da receita e o tipo de método de confeção podem afetar negativamente a estabilidade e acessibilidade das antocianinas em frutos frescos e que a incorporação de bagas em receitas que não são confeccionadas, como a mousse, poderá ser a melhor forma de preservar o seu teor de antocianinas. No que respeita ao segundo estudo, conseguiu-se verificar que as bagas de sabugueiro podem ser uma boa escolha para a produção de um novo tempero, o vinagre, e que este poderá ser uma fonte de excelência em antocianinas e que poderá ser usado na culinária. Por fim, o terceiro estudo pode demonstrar que a utilização dos vinagres como tempero de carne possibilita a redução da formação de PAHs em carne de porco grelhada em carvão, de modo que a utilização de tempero com um vinagre rico em compostos fenólicos, especialmente antocianinas. Assim, deve ser incentivado a reduzir a exposição a esses compostos com potencial carcinogénico.

**Palavras chave:** receitas, processos de confeção, culinária, vinagre, PAHs, framboesa, baga de sabugueiro, antocianina

# ÍNDICE

ABSTRACT.....	ix
RESUMO.....	xi
ÍNDICE.....	xiii
LISTA DE FIGURAS .....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE ACRÓNIMOS E SIGLAS .....	xvi
ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO .....	1
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO .....	3
I.1. Antioxidantes .....	5
I.2. Fitoquímicos.....	8
I.3. Antocianinas.....	10
I.3.1 Efeitos das antocianinas na saúde.....	13
I.3.2. Alimentos ricos em antocianinas.....	17
I.3.3. Aplicação na culinária.....	20
I.3.3.1 Processos de confeção.....	20
I.3.4.2 Efeitos dos processos de confeção no teor de antocianinas .....	22
I.3.4.3 Efeitos das antocianinas na mitigação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos .....	24
CAPÍTULO II – ÂMBITO E OBJETIVOS .....	27
II.1. Objetivos Específicos .....	30
CAPÍTULO III – Anthocyanin content in raspberry and elderberry: effect of domestic cooking and recipe composition.....	31
CAPÍTULO IV – Evaluation of anthocyanin index in different stage in industrial production of elderberry vinegar.....	57
CAPÍTULO V – Effect of different vinegars on the Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Charcoal-Grilled Pork.....	73
CAPÍTULO VI – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....	101
CAPÍTULO VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Antioxidantes endógenos e exógenos.....	6
Figura 2 – Reação em cadeia de propagação das espécies reativas de oxigénio. ....	7
Figura 3 – Classificação dos fitoquímicos (Adaptado de Liu, 2004 (24)) .....	8
Figura 4 - Estrutura das antocianinas e antocianidinas .....	10

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Classificação dos frutos tendo em conta o tipo de antocianina (adaptada de Fang, 2014 (100)).....	19
Tabela 2 - Métodos de confeção frequentemente aplicados aos produtos hortícolas e fruta (fonte: adaptado Fabbri 2016(112) e Crosby 2012(113)).....	22

## **LISTA DE ACRÓNIMOS E SIGLAS**

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

PAH – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

DNA - Ácido desoxirribonucleico

AMPK – Cínase de 5'-monofosfato-adenosina

ORAC - Capacidade de absorção de radicais de oxigênio

PPAR $\gamma$  – Receptor do Peroxissoma proliferador ativado

RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro

TNF-alfa – Fator de Necrose Tumoral alfa



# **ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO**

Esta dissertação está organizada em sete capítulos com base nos manuscritos que este trabalho tem originado.

## **Capítulo I - Introdução**

Este capítulo apresenta a base de conhecimento que está subjacente à motivação, aos objetivos, e as estratégias que foram seguidas para o desenvolvimento desta dissertação. Em primeiro lugar, apresenta uma revisão dos efeitos das antocianinas na saúde, presentes em diferentes alimentos ricos em antocianinas, bem como, compreender a influencia dos métodos culinários na preservação dos seus efeitos benéficos na saúde.

## **Capítulo II – Motivação e objetivos**

Nesta seção, apresenta-se a motivação que impulsionou o desenvolvimento desta dissertação, enquadrando as questões de investigação levantadas, o objetivo geral e os objetivos específicos, que vão conduzir a investigação para a obtenção das respostas às questões de investigação colocadas.

## **Capítulo III –Anthocyanin content in raspberry and elderberry: effect of domestic cooking and recipe composition.**

Neste trabalho apresentam-se os efeitos no teor de antocianinas após a incorporação de duas fontes de antocianinas: a framboesa e a baga de sabugueiro, em receitas tradicionais, quando submetidos a diferentes processamentos culinários.

## **Capítulo IV –Evaluation of anthocyanin index in different stage if industrial production of elderberry vinegar**

Neste trabalho foi realizado o desenvolvimento de um vinagre de baga de sabugueiro, tempero rico em antocianinas, desenvolvido numa unidade de produção industrial.

Posteriormente foi avaliada a estabilidade do teor de antocianinas ao longo do processamento.

### **Capítulo V – Effect of different vinegars on the Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Charcoal-Grilled Pork**

Neste capítulo é apresentada a avaliação do efeito das antocianinas de vinagres na mitigação da formação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em carne de porco, quando grelhada em carvão.

### **Capítulo VI – Conclusões e perspectivas futuras**

É apresentado no capítulo final desta dissertação uma análise crítica global, sendo que serão desenhados os principais resultados e conclusões dos trabalhos. Além disso, as limitações do trabalho experimental e perspectivas futuras são igualmente apresentadas.

## **CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO**



## **I.1. Antioxidantes**

A literatura tem evidenciado que o dano oxidativo é um dos fatores responsáveis pelo no processo de envelhecimento e na formação e desenvolvimento de diversas patologias. Neste sentido, têm sido desenvolvidos vários estudos sobre os fatores que poderão estar relacionados com a prevenção destas patologias, os quais têm apontado a ingestão de antioxidantes como cruciais nos processos preventivos dos danos oxidativos (1).

Os antioxidantes são compostos que têm a capacidade de inibir os processos de oxidação quando presente nos alimentos ou nos sistemas biológicos (2).

A oxidação é o processo através do qual os elétrons são transferidos de um átomo para outro, em que a molécula que perde o elétron é a molécula oxidada, podendo ser formados durante este processo radicais livres, nomeadamente durante a respiração aeróbia. Podem ainda ser formadas, neste processo, espécies reativas de oxigénio (ROS), que podem desempenhar uma importante ação fisiológica. Contudo, poderão também provocar efeitos tóxicos no organismo. A formação dos radicais livres poderá ainda ser influenciada por fatores externos como o tabaco, poluição, ação de raios ultravioletas e radiação ionizante. Os radicais livres, para além do envelhecimento prematuro, podem estar na origem de várias doenças como o cancro e doenças crónicas (3-5).

O organismo humano tem a capacidade de se adaptar às várias mudanças que ocorreram ao longo do tempo, tendo por isso desenvolvido sistemas de defesa para reduzir os danos causados pelas ROS (6). Os antioxidantes são o principal mecanismo de defesa do organismo para o ataque dos radicais livres atuando como sequestradores dos radicais livres (7). Assim, o corpo humano tem vários mecanismos que atuam contra o stresse oxidativo através da produção de substâncias que têm ação antioxidante - antioxidantes endógenos. Contudo, também na natureza, em especial nos produtos de origem vegetal, se podem encontrar compostos que têm ação antioxidante, não sendo estes produzidos pelo organismo – antioxidantes exógenos (figura 1)

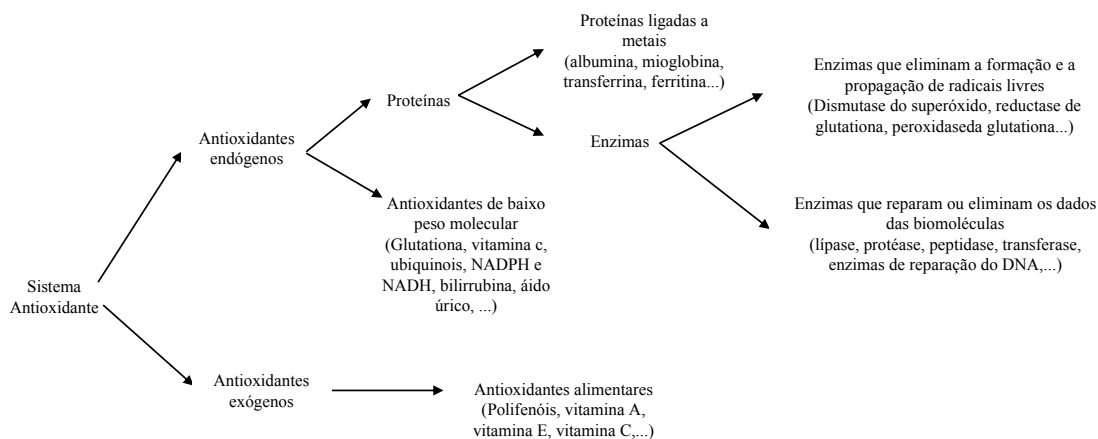


Figura 1 – Antioxidantes endógenos e exógenos.

Os antioxidantes endógenos dividem-se em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (8). A maioria dos antioxidantes enzimáticos envolvem-se instantaneamente na neutralização inicial da produção de radicais livres, nomeadamente a dismutase do superóxido, catalase, peroxidase da glutatona e a redutase da glutatona. Sendo o sistema respiratório o principal local onde se formam os radicais livres (superóxido, peróxido de hidrogénio e radicais hidroxilo) através da respiração (9).

O ataque dos radicais livres, sobretudo do radical hidroxilo, ao ácido desoxirribonucleico (DNA) nuclear, em particular ao N7 da guanina, é bem conhecido. Quando este é sujeito a uma agressão e não for reparado pelos processos de reparação habituais, tal poderá induzir a uma mutação da expressão genética e, por sua vez, ao desenvolvimento de cancro (10). Para além do dano no DNA, os radicais livres poderão também atuar junto dos lípidos, causando a peroxidação lipídica, podendo resultar na arteriosclerose, por exemplo (11). É por isso fundamental que os antioxidantes endógenos e exógenos possam mitigar a formação das espécies reativas de oxigénio, bem como dos radicais livres.

No que respeita aos antioxidantes exógenos, estes não são produzidos pelo organismo, devendo para o efeito ser consumidos através da alimentação. São exemplos a vitamina C, a vitamina E, os carotenoides, minerais como o selénio, magnésio e o zinco, e os polifenóis (8). Estes compostos estão presentes nos produtos de origem vegetal, com especial enfoque nos produtos hortícolas e na fruta. Efetivamente o consumo de fruta e produtos hortícolas tem sido associado a vários efeitos benéficos na saúde, nomeadamente na prevenção da doença cardiovascular (12), cancro (13), diabetes (14), e doença inflamatória (15). Os hortofrutícolas têm na sua constituição vários componentes

responsáveis pelos efeitos benéficos no organismo, por exemplo, o elevado teor em fibra (13), vitamina C, carotenoides, vitamina E, potássio, zinco, selénio, e polifenóis. Contudo, vários autores referem que o consumo excessivo de alguns antioxidantes pode ser prejudicial, nomeadamente na ligação que alguns compostos fenólicos poderão estabelecer com as proteínas e induzir à sua precipitação e prejudicar a biodisponibilidade (16).

De facto, a ação dos antioxidantes está descrita por vários autores como sendo compostos capazes de retardar ou inibir a formação de radicais livres ou interromper a fase de propagação destes compostos. Esta ação poderá ocorrer por vários mecanismos: 1) eliminação das ROS no início da peroxidação; 2) quelação dos iões metálicos, por exemplo o  $Fe^{2+}$  através da reação de Fenton; 3) quebra da cadeia da reação autoxidativa; e 5) redução da concentração de  $O_2$ . Os antioxidantes mais eficazes são aqueles que conseguem interromper a reação em cadeia dos radicais livres. Estes compostos contêm, na sua maioria, anéis aromáticos ou fenólicos que têm a capacidade de doar o hidrogénio (H) ao radical livre formado durante o processo de oxidação tornando-se assim um radical. Estão descritas duas vias de atuação dos antioxidantes preventivamente nos processos oxidativos. Assim, a primeira via é a transferência do átomo H, importante no caso da peroxidação lipídica. Uma vez iniciado o processo oxidativo o radical R, molécula altamente instável, começa a reagir com os lípidos em cadeia convertendo-os em hidroperóxido lipídicos, figura 2. O papel dos antioxidantes é interromper a cadeia de reação oxidativa, pelo que para serem efetivos os antioxidantes deverão a molécula deverá ser relativamente estável reagindo assim lentamente com o substrato, mas rapidamente com o radical livre (17, 18).

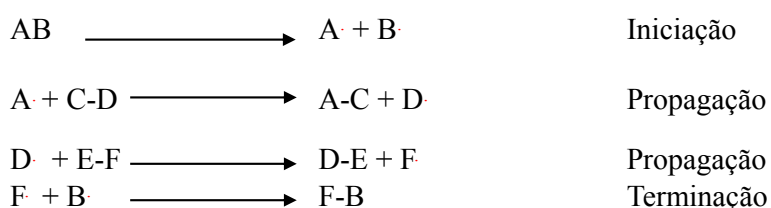


Figura 2 – Reação em cadeia de propagação das espécies reativas de oxigénio.

Dos principais compostos com capacidade antioxidante conhecidos são os fitoquímicos, que não sendo considerados essenciais ao funcionamento do organismo humano desempenham uma ação crucial no combate aos radicais livres e às ROS.

## I.2. Fitoquímicos

Os fitoquímicos são “constituintes não-nutrientes de produtos de origem vegetal que apresentam uma ação benéfica ou prejudicial após a sua ingestão”(19). Nos produtos de origem vegetal, os fitoquímicos apresentam várias funções, nomeadamente, de pigmentação e de proteção relativamente ao dano oxidativo provocado pela luz (por exemplo, antocianinas, licopeno), defesa contra pragas e doenças (por exemplo, glicosinolatos), e prevenção de stress oxidativo induzido pela luz ultra-violeta (por exemplo, carotenóides, antocianinas, flavonóis). Para além das funções existentes na matriz celular vegetal para a proteção da célula, vários autores têm demonstrado que uma alimentação rica em produtos hortofrutícolas, e por consequência rica em fitoquímicos, está associada a uma redução das doenças crónicas (20-22).

Os efeitos destes compostos estão associados à sua ação pleiotrópica e a mecanismos complementares, incluindo a modulação de enzimas de biotransformação (fase 1 e de fase 2), a estimulação do sistema imunitário, redução da agregação plaquetária, modulação de lipídios e metabolismo hormonal, ação antioxidante, ação antiinflamatória, ação antibacteriana, ação antimutagénica, ação antiangiogénica, redução da iniciação tumoral, promoção e indução de apoptose (23). Os fitoquímicos constituem um grupo heterogéneo de componentes, existindo mais de mil tipos de fitoquímicos, podendo classificar-se em: carotenóides, fenólicos, alcalóides, compostos azotados e compostos organossulfurados. O grupo dos fenólicos engloba muitas famílias diferentes, cada uma delas incluindo centenas de moléculas (figura 3).

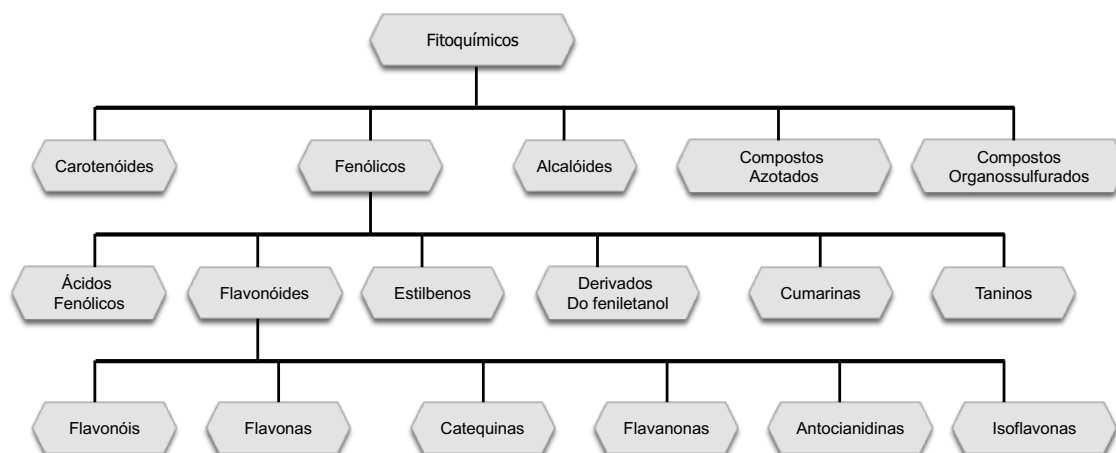


Figura 3 – Classificação dos fitoquímicos (Adaptado de Liu, 2004 (24)).



Os polifenóis são responsáveis pelas principais características organolépticas dos alimentos de origem vegetal, particularmente a cor e o sabor. Está descrito que estes compostos podem ter benefícios para a saúde associados ao elevado consumo de produtos hortícolas, de fruta e de leguminosas, mas também pelo consumo de bebidas como o chá e o vinho. Os alimentos contêm vários tipos de polifenóis (25), e dado que são metabolitos secundários das plantas, os seus teores dependem de muitos fatores. Estes fatores podem ser de natureza ambiental, tais como a exposição ao sol, a precipitação, o tipo de cultura, a quantidade de fruta na árvore, o grau de maturação, o armazenamento, a utilização ou não de pesticidas e, por último os métodos da preparação culinária utilizados para o seu consumo (26, 27). A maioria dos polifenóis tem algum tipo de atividade biológica, nomeadamente capacidade antiinflamatória, antimicrobiana, antioxidantes ou antitumoral (28).

Os polifenóis são fitoquímicos que resultam do metabolismo secundário das plantas, aumentando a probabilidade de sobrevivência em ambientes hostis, como por exemplo na presença de pragas. Neste sentido, são componentes importantes para melhorar os mecanismos de defesa, propagação e desenvolvimento das plantas, sendo responsáveis pelas cores, aroma, sabor, amargura e adstringência das plantas (29).

Os polifenóis encontram-se presentes nos frutos e produtos hortícolas. Estes compostos são importantes não só em termos de qualidade, aparência e sabor dos alimentos, como também do ponto de vista terapêutico, designadamente na prevenção de várias patologias (30, 31)

Existem vários tipos polifenóis que podem ser divididos em grupos diferentes, dependendo da sua estrutura química (figura 3). Os compostos flavonóides constituem um grupo muito importante devido à sua capacidade de proteger o organismo contra os radicais livres e as ROS produzidos durante o metabolismo (32-35).

A estrutura dos polifenóis varia entre moléculas simples, como os ácidos fenólicos, e moléculas altamente polimerizadas, como os taninos. Os principais subgrupos de polifenóis são definidos de acordo com o número de anéis fenólicos e elementos estruturais que ligam esses anéis uns aos outros (36): ácidos fenólicos, flavonóides e os estilbenos e lignanas. Os ácidos fenólicos são estruturas relativamente simples que compreendem duas subclasses: ácidos hidroxibenzóicos (ácidos salicílico, gálico e

vanílico) e ácidos cinâmicos (ácidos cafeico e felúrico). O grupo mais amplo de fenólicos são os flavonóides. Estes compostos têm a estrutura comum de difenilpropanos (C6-C3-C6), composta por dois anéis aromáticos ligados através de três carbonos que, geralmente, formam um heterocíclico oxigenado (36). Os flavonóides podem ser subdivididos em 14 subclasses com base no grau de oxidação do anel heterocíclico: chalconas, dihidrocalos, auronas, flavonas, flavonóis, diidroflavonóis, flavanonas, flavanóis, flavandióis, antocianidinas, isoflavonas, flavononas e proantocianidinas (16). A grande complexidade do universo de polifenóis também reside no potencial de múltiplas interações com outros grupos, como açúcares, álcoois e ácidos. Efetivamente os flavonóides mais comuns são normalmente encontrados em alimentos ligados a açúcares, ácidos ou álcoois e estes compostos também podem ter atividade biológica (37)

Os polifenóis dividem-se em várias categorias, no entanto o presente trabalho debruçar-se-á sobre as antocianinas, devido às suas características e propriedades benéficas na saúde que serão exploradas detalhadamente na secção I.3.

### I.3. Antocianinas

As Antocianinas (grego "anthos" = flor; "kyanos" = azul) são uma classe de metabolitos secundários nas plantas responsáveis pela atribuição das cores vermelhas, roxas e azuis de vários tipos de hortofrutícola. As diferenças de cor entre antocianinas são amplamente determinadas pelo padrão de substituição do anel-B fenólico aglicão, antocianidina, pelo padrão de glicosilação e pelo grau de esterificação dos açúcares (figura 4). As antocianinas são a forma de glicosídeo, enquanto as antocianidinas são conhecidas como o aglicão.

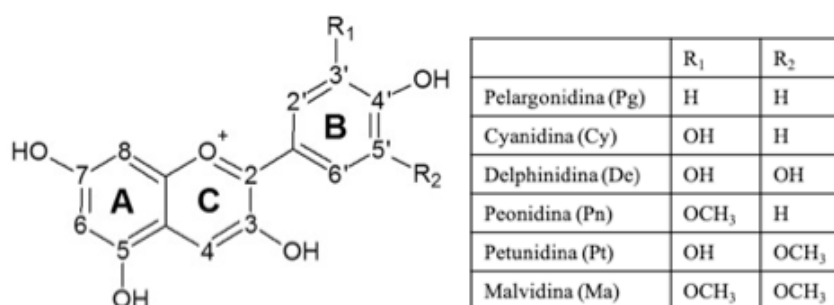


Figura 4 - Estrutura das antocianinas e antocianidinas

Estes compostos encontram-se naturalmente presentes em vários produtos de origem vegetal, desde logo nos produtos hortícolas, como a couve-roxa e a beterraba, na fruta,

como as framboesas, as bagas de sabugueiro e os mirtilos, nos tubérculos, como a batata doce laranja e roxa, mas também em alguns cereais, como no arroz e nas leguminosas, como o feijão preto (38, 39).

Além disso, a cor também é influenciada por outros parâmetros como pH, temperatura, tipo de solvente, e a presença de copigmentos (40). As variações estruturais das antocianinas são devidas às diferenças na hidroxilação das moléculas, no grau de metilação, bem como, da natureza, do número, e da posição do açúcar que se encontra no aglicão. Atendendo à sua natureza química as antocianinas ocorrem naturalmente como sais de glicosídeos de flavílios (2-fenilbenzopirílio) sendo comumente definidas em seis antocianidinas: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina, e malvidina, encontrando-se frequentemente ligadas aos grupos dos açúcares: glicose, galactose, ramnose, arabinose, e xilose (41). A maioria das antocianinas presentes nos frutos são glicosiladas na posição 3-OH e, com menos expressão, nas posições 3-OH e 5-OH. Estes compostos têm características físico-químicas que lhes conferem cor e estabilidade, no entanto, estas são moléculas altamente reativas e por isso muito sensíveis às reações de degradação (38). A exposição ao oxigénio a determinadas condições de temperatura, luz, enzimas e o pH são alguns dos fatores que poderão afetar quimicamente as antocianinas e, conseqüentemente, a sua cor e estabilidade. Assim, as antocianinas podem-se degradar devido a vários processos, designadamente, durante o processo de extração, processamento alimentar e durante o armazenamento (38, 42).

Para além dos fatores referidos a estabilidade das antocianinas é dependente do tipo de pigmento, copigmentos, presença de iões metálicos, de oxigénio, enzimas e outros antioxidantes (43). A estabilidade das antocianidinas também é influenciada pelo anel-B na estrutura da antocianidina e pela presença de grupos hidroxilo (44), estes grupos são conhecidos por promover a diminuição da estabilidade das antocianidinas.

Conforme já foi referenciado, a cor das antocianinas depende do pH do meio em que se encontram, uma vez que a estrutura molecular das antocianinas tem natureza iónica (43), em condições ácidas, algumas das antocianinas aparecem vermelhas, a pH neutro têm uma tonalidade roxa em pH neutro, enquanto a cor muda para azul em condições de pH alcalino. Os pigmentos de cor vermelha das antocianinas encontram-se predominantemente na forma de catiões de flavílio (45) sendo esta forma mais estável em pH ácido o que permite um aumento da solubilidade em água das antocianinas. Para além do pH, a copigmentação e a temperatura são fatores que poderão influenciar a mudança

da cor das antocianinas. Assim, está indicado que a copigmentação do aglicão da antocianina é o fenómeno no qual a cor das antocianinas é estabilizada por copigmentos como iões metálicos ou flavonóides (46).

As antocianinas são menos estáveis em temperaturas mais elevadas. Um estudo revelou que o tratamento térmico a 35°C reduziu o teor de antocianinas nas uvas para menos de 50% da quantidade presente no controlo que se encontrava a 25°C (47). Um outro estudo permitiu verificar que, a exposição a uma temperatura de 40°C, a cor da antocianina muda de vermelho para laranja, mesmo a pH ácido (48). Por outro lado, o tratamento térmico de extratos ricos em antocianinas parece não causar a sua degradação, uma vez que os extratos que contêm compostos fenólicos não serão degradados pela polifenol oxidase que se poderá encontrar inativada quando a temperatura aumenta até aos 50°C (49). Consequentemente, o tratamento térmico suave de matérias-primas ricas em antocianinas, tais como o branqueamento, pode impedir a oxidação das antocianinas pela polifenol oxidase.

No que diz respeito à solubilidade, as antocianinas são solúveis em água e na maioria dos solventes orgânicos, não sendo solúveis em solventes orgânicos apolares. Conforme já referido, as condições ácidas do meio mantêm a estabilidade do catião flavílio (50). Por outro lado, a estrutura polifenólica da antocianina confere hidrofobia à molécula, tornando-a solúvel em solventes orgânicos, como o etanol e o metanol. Além dos catiões de flavílio, a solubilidade da antocianidina na água pode ser devida ao grupo 3-hidroxilo no anel-C da antocianidina ligado ao açúcar, formando uma molécula estável em água. Tendo em conta o tipo de antocianidinas poderá haver diferença na solubilidade, assim, a malvidina, peonidina, e petunidina são menos solúveis na água comparativamente à cianidina, ao delphinidina, e a pelargonidina, uma vez que estas antocianidinas têm um ou mais grupos hidrofóbicos metoxi em posições 3', 5', e 3' e 5' do anel-B. A solubilidade das antocianinas na água aumenta para valores de pH mais baixos, ocorrendo fortes reações de protonação (51). Assim, a adição de ácido clorídrico (HCl) ao álcool aumenta a solubilidade das antocianinas (52). A reação de malonilação das antocianidinas também promove a sua solubilidade em água e estabiliza a sua estrutura(53), uma vez que a malonilação do aglicão das antocianinas preserva a sua cor. No entanto, a cor da antocianina é muito dependente do número de grupos hidroxilo ligados ao anel-B.

Encontrando-se amplamente distribuídas em vários alimentos de origem vegetal, é conhecido que as antocianinas apresentam uma importante ação antioxidante com vários

benefícios na saúde, nomeadamente cardioprotetores, neuroprotetores, anti-inflamatório, e propriedades anticancerígenas, conforme descrito a seguir (54).

### **I.3.1 Efeitos das antocianinas na saúde**

O consumo de produtos hortofrutícolas tem sido amplamente associado à redução do risco e prevenção do aparecimento de doenças crónicas, como as doenças cardiovasculares, a diabetes e a obesidade (55, 56). Estes alimentos são constituídos por vários componentes com ação protetora do organismo, particularmente os compostos fenólicos, que poderão influenciar os processos inflamatórios, as reações oxidativas e processos endoteliais e metabólicos envolvidos na patogénese de diversas patologias (57-61).

Os efeitos nutricionais e terapêuticos das antocianinas têm sido amplamente estudados, tendo sido demonstrados diversos benefícios para o seu consumo. Estes benefícios na saúde são o reflexo de efeitos antioxidantes, prevenção da doença cardiovascular, do cancro, da diabetes, da obesidade, melhoria da saúde visual, ação antiangiogénica, antimicrobiana, e como neuroprotetores.

Os efeitos terapêuticos das antocianinas são principalmente atribuídos às suas atividades antioxidantes. Como descrito na literatura (62, 63), as calconas e as bases quinoidais com uma ligação dupla conjugada ao grupo ceto constituem antioxidantes eficientes na eliminação de radicais livres. Além disso, a estrutura do anel B glicosilado das antocianinas contribui para a elevada atividade antioxidante, onde a orto-hidroxilação e a metoxilação aumentam substancialmente a atividade antioxidante (64).

As antocianidinas têm uma capacidade de absorção de radicais de oxigénio (valor ORAC) superior do que as antocianinas, uma vez que o aglicão das antocianinas é muito instável e altamente reativa (65). As antocianinas apresentam um açúcar extra na posição C-3 no anel C heterocíclico, tendo por isso menor atividade antioxidante do que a antocianidina que apresenta apenas uma única molécula de açúcar (66).

A literatura tem demonstrado que antocianinas extraídas de produtos de origem vegetal possuem propriedades antioxidantes. Pelargonidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, e delphinidin-3-glicosídeo isolados do revestimento de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. (feijão preto), bem como os seus aglicões padrão têm forte atividade antioxidante no sistema lipossomal e redução da formação de malondialdeído pela radiação de UVB (67). Outros autores verificaram que a delphinidina-glicodido e a delphinidina-3-glucoídeo proporcionaram um maior efeito inibitório na peroxidação lipídica e na eliminação do

radical superóxido. Pelo contrário, a pelargonidina conduziu ao efeito inibitório mais elevado para a eliminação do radical hidroxilo. No que respeita à cianidina e à cianidina-3-glicosídeo foi verificado que têm o maior efeito inibitório na oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) induzida por cobre (II) comparativamente com os outros ácidos fenólicos (68).

As células endoteliais são as principais células envolvidas no processo de angiogénese. Distúrbios na angiogénese fisiológica podem contribuir para várias doenças, nomeadamente doença cardiovascular, cancro e complicações da diabetes como a retinopatia e nefropatia. A angiogénese depende do equilíbrio entre os fatores angiogénicos e os antiangiogénicos (69, 70).

O efeito antiangiogénico das antocianinas tem sido relatado por vários estudos. Foi observado que extratos ricos em antocianinas de várias bagas (mirtilo, uva, groselha, baga de sabugueiro e morango) suprimem significativamente o peróxido de hidrogénio e a expressão do TNF- $\alpha$  induzido pelo fator de crescimento endotelial vascular expresso pelos queratócitos (71).

Estudos epidemiológicos mostram uma relação inversa existente entre o consumo de alimentos ricos em antocianinas e a doença cardiovascular. Em estudos *in vitro* foi demonstrado o seu efeito antitrombótico (72). O efeito antitrombótico foi demonstrado por outros autores que analisaram o efeito da ingestão, durante oito semanas, de sementes de milho ricas em antocianinas em ratos, tendo sido verificado que o grupo de animais que recebeu esta alimentação apresentou menor suscetibilidade de sofrer lesão por isquemia e redução do tamanho do enfarte com aumento de enzimas antioxidantes mitocondriais. A cardioproteção foi associada a níveis miocárdicos aumentados da glutathiona, sugerindo que as antocianinas podem modular as defesas antioxidantes (73). Contudo, estes dados são ainda controversos, visto vários autores não terem encontrado associação entre o consumo de alimentos ricos em antocianinas e ação protetora ao nível cardiovascular (74, 75).

As antocianinas têm sido amplamente estudadas tendo em conta as potenciais propriedades anticarcinogénicas. A angiogénese é um dos fatores chave para o desenvolvimento do cancro, sendo descrito como um passo importante na transição de tumores do estado benigno para o estado maligno. Na prevenção do cancro, a antiangiogénese é o processo que impede a formação de novos vasos sanguíneos que fornecem oxigénio e nutrientes às células tumorais. Vários fitoquímicos, incluindo os flavonóides e as antocianinas, são potenciais agentes antiangiogénicos. Estudos têm

mostrado que a ingestão de alimentos ricos em antocianina têm potencial quimiopreventivo. Vários ensaios clínicos verificaram que as antocianinas inibem a proliferação celular, a inflamação e a angiogênese, e induzem a apoptose das células tumorais (76). Assim, as antocianinas poderão ter um potencial em quimioprevenção (77-79).

Vários autores têm estudado a ação de alimentos ricos em antocianinas na prevenção da diabetes. Jayaprakasam et al.(80) investigaram a capacidade das antocianinas, cianidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-glucosídeo, cianidina-3-galactosídeo e pelargonidina-3-galactosídeo, e antocianidinas, cianidina, delphinidina, pelargonidina, malvidina e petunidina, na estimulação *in vitro* da secreção de insulina a partir das células beta-pancreáticas de Rato (INS-1 832/13) e na presença de 4 e 10 mM de glicose. Assim, verificaram que a cianidina-3-glicosídeo e a delphinidina-3-glicosídeo foram os compostos mais eficazes na secreção de insulina, mais eficazes entre as antocianinas e antocianidinas testadas. No caso da pelargonidina-3-galactosídeo e da pelargonidina, estas promoveram um aumento da secreção de insulina de 1,4 vezes. A capacidade das antocianinas para induzirem a secreção de insulina poderá ser devida ao número de grupos do hidroxilo no anel-B das antocianinas. No entanto, a cianidina, a delphinidina, a pelargonidina, a malvidina e a petunidina poderão não potencializar, de forma significativa, a secreção de insulina. Takikawa et al (81) verificaram que uma alimentação rica em antocianinas melhora a hiperglicemia e a sensibilidade à insulina através da ativação da cínase do 5'-monofosfato-adenosina (AMPK), para além disso reduziu significativamente a concentração de glicose no sangue e melhorou a sensibilidade à insulina. Assim, foi verificado que a AMPK foi ativada no tecido adiposo amarelo, no músculo esquelético, e no fígado. Esta ativação foi acompanhada pela regulação do transportador 4 da glicose (GLUT4) no tecido adiposo amarelo e no músculo esquelético e pela supressão da produção da glicose e dos lípidos no fígado. Ao mesmo tempo, a carboxilase da acetil-CoA foi inativada e a oxídase da acil-CoA, e a palmitoiltransferase-1 da carnitina foram reguladas no fígado. Estas alterações conduziram à melhoria da hiperglicemia e à redução da resistência das células à insulina na diabetes tipo 2.

As antocianinas são compostos bioativos importantes para manter a boa visão. Os pequenos frutos vermelhos são tradicionalmente conhecidos pela ação benéfica que exercem no olho e são frequentemente associados à melhoria da visão noturna. Foi verificado que a administração oral de extrato da uva (com cerca de 39% de antocianinas) às seis semanas de idade em ratos poderá impedir o prejuízo da função do fotorreceptor

durante a inflamação retinal (82). Outro estudo com 132 pacientes com glaucoma de tensão normal foram suplementados com duas cápsulas de antocianinas (60,0 mg de antocianina em cada cápsula) de mirtilo diariamente e melhoraram a função visual, com base no teste de campo visual de Humphrey (83). Também a suplementação de antocianinas de groselha (50 mg/dia) durante 24 meses aumentou o fluxo sanguíneo ocular em 19 doentes com glaucoma de ângulo aberto, porém, não houve alterações significativas na pressão intraocular (84).

Vários estudos têm demonstrado os efeitos do consumo de antocianinas na prevenção da obesidade. Ratos obesos alimentados com milho roxo, rico em cianidina-3-glicosídeo, durante 12 semanas reduziram o peso corporal, bem como diminuições nos pesos de tecido adiposo amarelo e castanho (85). Estes autores demonstraram que a hiperglicemia, a hiperinsulinemia, a hiperleptinemia, e o aumento do fator de necrose do tumor (TNF-alfa) e o nível do mRNA que ocorreram nos ratos obesos são normalizados quando tratados com uma alimentação rica em antocianinas provenientes do milho roxo. A ingestão de milho roxo pelos ratos também suprimiu os níveis de mRNA de enzimas envolvidas na síntese dos ácidos gordos e de triacilglicerol. Estes reguladores podem contribuir para a redução de triacilgliceróis no tecido adiposo amarelo. A obesidade está fortemente associada à disfunção adipocitária, por isso, a regulação da secreção proteica do adipócito ou da expressão gênica específica do adipócito é um dos alvos mais importantes para a prevenção da obesidade. Tsuda et al (86) investigaram ainda a potência das antocianinas, particularmente a cianidina e a cianidina-3-glicosídeo em adipócitos isolados de ratos para efeito de prevenção da obesidade. Estes autores demonstraram que os adipócitos tratados com antocianinas aumentaram a adiponectina, as secreções de leptina e a expressão genética adipócito-específica sem ativação do PPAR $\gamma$  nos adipócitos isolados de ratos.

Compostos polifenólicos, incluindo antocianinas, possuem atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de microrganismos, especialmente na inibição do crescimento de patógenos de origem alimentar (87). As antocianinas apresentam assim atividade antimicrobiana através de diversos mecanismos, como o dano celular induzido, destruição da parede celular, da membrana e da matriz intercelular (88).

O termo “neuroproteção” tem sido definido como a proteção das células nervosas a partir de lesão oxidativa e de neurotoxicidade, que interfere com a cascata isquêmica. Assim, um agente neuroprotetor pode ser um fármaco ou um composto natural que impedirá o desenvolvimento de lesões secundárias no sistema nervoso. Tarozzi A. et al. (89)



demonstraram a cianidina e o ácido protocatecuico, *in vitro*, têm ação neuroprotetora podendo promover assim a saúde cerebral, através da elevada atividade antioxidante demonstrada quer ao nível na membrana quer ao nível no citosol celular, bem como pela ação da cianidina na inibição nos eventos de apoptótico induzidos pelo peróxido de hidrogénio. Existe forte evidência através de estudos epidemiológicos que sugerem a atividade neuroprotetora das antocianinas no que respeita ao desempenho cognitivo, memória e motor, indicando o seu potencial aplicação para a prevenção de muitas doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer (90, 91). A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa que envolve a perda de neurónios dopaminérgicos da região do mesencéfalo, a morte destas células pode ser a causa da progressão da doença. Strathearn et al. (92) demonstraram que extratos ricos em antocianinas de mirtilo, semente de uva, hibisco, groselha e amoreira chinesa suprimiam, significativamente, a indução da morte das células dopaminérgicas uma vez que interferem na ativação da microglia e melhora a disfunção mitocondrial. A disfunção mitocondrial causada pelo stress oxidativo pode também conduzir a dano neuronal após um acidente vascular cerebral.

Em sumula, dados epidemiológicos apontam para uma forte evidência do papel protetor do consumo de compostos polifenólicos, presentes na alimentação, relativamente a diferentes patologias (cancro, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, diabetes, entre outras) (93, 94). Mais recentemente foram encontrados dados bioquímicos, moleculares, que corroboram esta mesma premissa. Atualmente são já reconhecidas as propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimutagénicas e/ou anticarcinogénicas de muitos destes compostos (94, 95).

### **I.3.2. Alimentos ricos em antocianinas**

Conforme descrito anteriormente, as antocianinas são um grupo de pigmentos solúveis em água que conferem a cor azul, roxa e vermelha a alguns frutos e produtos hortícolas, assim os benefícios na saúde das antocianinas têm sido objeto de investigação intensiva nos últimos 20 anos. Assim, está descrito que o tipo e a concentração de antocianinas diferem amplamente entre os diferentes tipos de fruta e hortícolas, pelo que os níveis de ingestão de antocianinas irá variar por região, estação do ano, e entre indivíduos com diferentes sociais, culturais e educacionais (96-99).

Em 2014 Jim Fang (100) realizou um trabalho de revisão bibliográfica abrangente e resultou na compilação das principais antocianinas encontradas em diferentes frutos. Na tabela 1 poder-se-á encontrar as principais antocianinas encontradas no referido estudo. Assim, os frutos podem ser divididos com base nos tipos de aglicão de antocianina, ou seja, o grupo pelargonidina, o grupo cianidina/peonidina e o grupo de antocianinas múltiplas.

O presente trabalho debruçar-se-á no estudo analítico do efeito da aplicação de processos de confeção tradicionais no teor de antocianinas na baga de sabugueiro e na framboesa.

Tabela 1 – Classificação dos frutos tendo em conta o tipo de antocianina (adaptada de Fang, 2014 (100))

Nome	Nome em Latim	Principais antocianinas
<b>Grupo Pelargonidina</b>		
Morango	<i>Fragariaspp.</i>	Pg-3-glc>>Cy-3-glc, Pg-3-rut
<b>Grupo cianidina e peonidina</b>		
Amora artica	<i>Rubus arcticus</i>	Cy-3-glc, Cy-3-rut
Acaí	<i>Euterpe olerácea</i>	Cy-3-rut>Cy-3-glc
Framboesa preta	<i>Rubus occidentalis</i>	Cy-3-glc, Cy-3-dioxaloyl-glc, Cy-4-rut, Cy-3-xyl-rut, Cy-3-sam-5-rham
Amora preta	<i>Rubus spp.</i>	Cy-3-glc>Cy-3-rut, Cy-3-dioxaloyl-glc
Abrunho	<i>Prunus spinosa</i>	Cy-3-rut, Cy-3-glc, Pn-3-rut, Pn-3-glc
Laranja de sangue	<i>Citrus sinensis</i>	Cy-3-glc, Cy-3-(6"-malonyl)glc
Fruta de capulina	<i>Prunus salicifolia</i>	Cy-3-rut>Cy-3-glc
Ginja	<i>Prunus cerasus</i>	Cy-3-glc-rut>Cy-3-rut
Cerejas	<i>Prunus avium</i>	Cy-3-rut>>Cy-3-glc
Aronia	<i>Aronia melanocarpa</i>	Cy-3-gal, Cy-3-ara
Cereja da virginia	<i>Prunus virginiana</i>	Cy-3-rut>Cy-3-glc
Arandos	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	Pn-3-gal, Pn-3-ara, Cy-3-gal, Cy-3-ara, Pn-3-glc
Groselha	<i>Ribes rubrum</i>	Cy-3-O-(2"-xyl)rut>Cy-3-sam, Cy-3-rut
Baga de sabugueiro	<i>Sambucuspp.</i>	Cy-3-glc, Cy-3-sam, Cy-3-sam-5-glc
Bagas de mel	<i>Lonicera caerulea</i>	Cy-3-glc>>Cy-3-rut, Pn-3-glc, Cy-3,5-diglc
Arando vermelho	<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	Cy-3-gal>>Cy-3-ara, Cy-3-glc
Amora	<i>Morus spp.</i>	Cy-3-glc>Cy-3-rut
Ameixa	<i>Prunus spp.</i>	Cy-3-glc, Cy-3-rut
Framboesa	<i>Rubus idaeus</i>	Cy-3-sophoroside, Cy-3-glc, Cy-3-rut, Cy-3-glc-rut
Framboesa do pacifico	<i>Amelanchier alnifolia</i>	Cy-3-gal>Cy-3-glc, Cy-3-ara, Cy-3-xyl
<b>Grupo de multiplas antocianinas</b>		
Acerola	<i>Malpighia emarginata</i>	Cy-3-rham>Pg-3-rham
Mirtilo	<i>Vacciniumspp.</i>	De-3-gal, Ma-3-gal, Pt-3-gal, Pt-3-ara, Ma-3-glc, Ma-3-ara, De-3-glc, De-3-ara, Cy-3-gal
Mirtilo selvagem	<i>Vacciniumspp.</i>	Ma-3-glc, Ma-3-gal, De-3-glc, Pt-3-glc, Pg-3-glc, Ma-3-ara, Cy-3-gal, Cy-3-ara, Cy-3-glc, De-3-gal, Pt-3-gal
Mirtilo	<i>Vacciniumspp.</i>	De-3-gal, De-3-ara, De-3-glc, Cy-3-ara, Cy-3-gal, Ma-3-glc, Cy-3-glc, Pt-3-glc, Pt-3-gal, Pt-3-ara, Pn-3-glc, Ma-3-ara
Groselha preta	<i>Ribes nigrum</i>	De-3-rut, Cy-3-rut>De-3-glc, Cy-3-glc
Empretum negro	<i>Empetrum nigrum</i>	De-3-gal, Cy-3-gal, Pn-3-glc, Ma-3-gal, Pt-3-gal, Pn-3-gal, Cy-3-ara
Davidsonia	<i>Davidsoniaspp.</i>	Cy-3-sam, De-3-sam, Pt-3-sam, Pn-3-sam
Uvas viniculas	<i>Vitis vinifera</i>	Ma-3-glc>Ma-3-(6-acetyl)glc, De-3-glc, Pt-3-glc, Ma-3-(6-coumaryl)glc, Pn-3-glc, Pt-3-coumaryl-glc
Uvas vermelhas de mesa	<i>Vitis spp.</i>	De-3-glc, Cy-3-glc, Ma-3-glc, Pn-3-glc, Pt-3-glc, Ma-3-coumaryl-glc, Ma-3-acetyl-glc
Jamelão	<i>Syzygium cumini</i>	De-3,5-diglc, Pt-3,5-diglc, Ma-3,5-diglc
Maqui	<i>Aristotelia chilensis</i>	De-3,5-diglc, De-3-sam-5-glc, De-3-glc, Cy-3,5-diglc, De-3-sam

### **I.3.3. Aplicação na culinária**

#### *I.3.3.1 Processos de confeção*

O uso do fogo é uma das características fundamentais do modo de vida humano, uma que nos separa de todos os outros animais que se desenvolvem com a ingestão de alimentos crus (101). Está bem documentado a preparação e a confeção de alimentos melhoram o processo digestivo, visto influenciar o aparelho gastrointestinal, bem como a função de outros órgãos, como o cérebro. Na verdade, a sua introdução desempenhou um papel importante na evolução humana, como a diminuição do tamanho do intestino e o melhor aproveitamento da energia, o que tornou possível o desenvolvimento do cérebro (102). No entanto, ainda é desconhecido como ocorreu a introdução dos processos de confeção e de que forma afeta o padrão alimentar e a saúde, no entanto a tradição culinária é efetivamente marcada em alguns países, como é o caso dos países no mediterrâneo e em especial Portugal.

O padrão alimentar mediterrânico é um exemplo de práticas culinárias inteligentes e evolucionárias. Nos países do mediterrânico as práticas culinárias evoluíram com a evolução das civilizações, sendo que estas práticas exploram as potencialidades saudáveis dos vários alimentos (103).

A cozinha mediterrânica tem vindo a melhorar continuamente os procedimentos de confeção tendo em conta as matérias-primas disponíveis, com o objetivo de garantir por um lado o teor energético e por outro o melhor valor nutricional - micronutrientes e fitoquímicos - disponíveis nas matérias-primas. Este conhecimento, adquirido de forma empírica, que foi passando de geração em geração.

Cozinhar é o processo no qual se aplicam métodos de confeção que promovem alterações nos alimentos. Através da aplicação dos vários métodos de confeção o ato de cozinhar confere aos alimentos características únicas quer ao nível sensorial quer ao nível nutricional. Assim, o processo de confeção melhora o processo de digestibilidade dos alimentos, em geral, melhora a biodisponibilidade de diversos nutrientes (104), promove a segurança higio-sanitária dos alimentos, nomeadamente na diminuição da carga microorganismos(105), por outro lado, os processos de confeção poderão promover a perda de vários nutrientes, nomeadamente de antioxidantes, ferro, ácido fólico, entre outros (106-108), e promover a formação de compostos indesejáveis, nomeadamente carcinogénicos (109, 110).

As tipologias de métodos de confeção dependem de vários fatores, destacando-se três: o meio (água, ar ou gordura), a forma de transferências de calor (condução, convecção, radiação) e a temperatura (que está dependente do meio). Assim:

- O método de confeção “cozer” e o “cozer ao vapor” utiliza como meio a água, onde o alimento está mergulhado, ou o vapor de água, cuja temperatura não ascenderá os 100°C, e como meio de transferência de calor da água para o alimento a convecção, e dentro do alimento a condução.

- O método “estufar” usa como meio a água e em algumas situações a gordura, contudo neste método o alimento poderá não se encontrar totalmente mergulhado em água como ocorre no método de “cozer”, contudo os métodos de transferência de calor são os mesmos, ou seja a convecção, que ocorrerá através do ar e através da água

- O método “grelhar” utiliza como forma de transferência de calor a radiação, quando este processo ocorre na grelha, e a condução quando este processo ocorre na chapa, o meio é o ar ou o material que estará em contacto direto com o alimento, nomeadamente o inox, atingindo este uma temperatura que ascenderá os 220°C.

- O método “assar” o meio que este processo de confeção utiliza é o ar o qual poderá atingir a temperaturas elevadas, no caso de ser um forno a lenha, ou os 230°C no caso dos fornos elétricos com controlo de temperatura, as transferências de calor que ocorrem neste método são por convecção, podendo ainda ocorrer a condução em determinada zona do alimento, nomeadamente o que se encontra em contacto com o tabuleiro.

- O método “fritar” e “saltear” utiliza como meio uma gordura, que pela ação do calor se torna líquida, chegando a atingir os 190°C, neste método podemos distinguir dois métodos, frito por imersão, onde o alimento está mergulhado na gordura, ou frito por contacto onde o alimento está em contacto com a gordura e com o material utilizado, neste método a transferência de calor ocorre por convecção, no caso do frito por imersão, e por contacto no caso do frito por contacto ou no salteado;

- O método “estufar” usa como meio a água e em algumas situações a gordura, contudo neste método o alimento poderá não se encontrar totalmente mergulhado em água como ocorre no método de “cozer”, contudo os métodos de transferência de calor são os mesmos, ou seja a convecção, que ocorrerá através do ar e através da água (111).

Na tabela 2 encontram-se descritos os métodos de confeção frequentemente aplicados aos produtos hortícolas e fruta.

Tabela 2 - Métodos de confeção frequentemente aplicados aos produtos hortícolas e fruta (fonte: adaptado Fabbri 2016(112) e Crosby 2012(113))

Método	Definição
<b>Cozer</b>	Cozinhar os alimentos introduzidos em água fervente numa panela.
<b><i>Simmer</i></b>	Cozinhar alimentos em líquido que se encontre abaixo do ponto de ebulição.
<b><i>Sous-vide</i></b>	Cozinhar em vacuum utilizando bolsas e em temperaturas precisamente controladas.
<b>Cozer a vapor</b>	Cozinhar os alimentos através do vapor de água não contactando diretamente com a água
<b>Refogado</b>	Cozinhar os alimentos através de fritura por contacto utilizando pouca gordura.
<b>Guisar</b>	Refogar primeiro e depois adicionar água e deixar cozer.
<b>Fritar</b>	Cozinhar os alimentos em gordura quente em uma frigideira em um queimador quente.
<b>Assar</b>	Cozinhar alimentos utilizando um forno

#### 1.3.4.2 Efeitos dos processos de confeção no teor de antocianinas

Devido à disponibilidade sazonal, os frutos vermelhos estão sujeitos a vários tipos de processamento, incluindo congelamento, processamento térmico e enlatamento (114). Alguns estudos relatam uma redução considerável dos níveis de polifenóis em frutos vermelhos após o processamento (114, 115). Por exemplo, um decréscimo de 28-59% nos níveis de antocianinas e uma redução de 22-81% nos níveis de procianidinas foram verificados durante o processamento de sumo, enlatamento e puré de frutos vermelhos (115). A maioria destes estudos concentrou-se nos efeitos do armazenamento, congelamento, processamento térmico, extrusão e enlatamento em processos relacionados à produção de sumos, geleias e purés (114-116); no entanto, os frutos vermelhos são também frequentemente utilizados em produtos de panificação, como pães, bolos e biscoitos. Além disso, estes estudos foram feitos tendo em conta o processamento industrial e não tendo em conta os métodos de culinária tradicional.

Os efeitos dos métodos de confeção domésticos sobre o teor de antocianinas nos frutos vermelhos têm sido pouco investigados e pouca informação está disponível sobre os efeitos da matriz complexa de produtos de panificação contendo farinha, açúcar, gordura, agentes de fermentação e outros ingredientes na estabilidade dos polifenóis (117-119). De facto, embora tenha sido relatado um decréscimo nos teores de antocianina e procianidina em produtos com frutos vermelhos após o aquecimento, existem resultados conflitantes em relação à estabilidade desses flavonóides na massa e no forno (117-119).

Alguns autores têm demonstrado que o processo de confeção tem influência na composição nutricional dos produtos de origem vegetal, nomeadamente no que respeita ao teor de compostos antioxidantes (120).

Assim, os estudos sugerem que dependendo do processo de confeção poderão ocorrer mais ou menos perdas destes compostos, dependendo do tipo de alimento (120-123). Na batata foi verificado que o processo de confeção “fritura” foi o processo em que se verificou uma maior perda de compostos antioxidantes (120), por sua vez o método “cozer a vapor” em batata-doce (aumento de 9,4%) (122) e nos brócolos (sem redução significativa face ao controlo) (121) foi o método em que ocorreu um menor efeito nestes compostos.

Neste sentido, fatores como os métodos, a temperatura, o tempo de confeção e o tamanho do alimento, parecem ser os fatores que mais influenciam a atividade antioxidante dos alimentos. Alguns estudos verificaram que no tomate (124) e nos brócolos (125) o efeito térmico aumentou as capacidades antioxidantes destes alimentos (% capacidade de eliminação do radical (RSC) em brócolos: cru 73,8%, cozido em água 87,0%, cozido ao vapor 89,0%;, por outro lado, em alimentos como cenouras, couve-branca e cebolas (125) o efeito térmico promoveu a redução da atividade antioxidante (%RSC em cenoura: cru 40,4%, cozido em água 5,6%, cozido ao vapor 9,2%; cebola: cru 60,6%, cozido em água 14,8% e cozido ao vapor 14,1%; couve-branca: cru 41,0%, cozido em água 26,9%%, cozido ao vapor 22,5%).

No que respeita às antocianinas, numa revisão realizada por Palermo et al. de 2014 (126) foram analisados 20 artigos que relacionavam o efeito do processo de confeção no teor de antocianinas. Este trabalho pode verificar que os estudos existentes apresentam dados opostos. Este facto pode ser explicado pela estabilidade das antocianinas nos alimentos ser grandemente influenciada pelo pH, temperatura, ligações glicosídicas e pela interação da matriz alimentar que ocorrem durante o processamento (127). Além disso, a glicosilação e a acetilação aumentam a estabilidade, tornando os dissacarídeos mais estáveis do que os seus homólogos monossacarídeos (128). Esta revisão verificou em quatro estudos o aumento do teor de antocianinas em oito tipos de batatas cozidas ao vapor, tendo os autores atribuído ao seu aumento à rutura das paredes das células das células, proporcionando uma melhor extração destes compostos devido à quebra dos polissacarídeos químicos de polifenóis de maior peso molecular, formando polifenóis solúveis de peso molecular e a interconversão entre diferentes formas químicas. Contudo,

existe um maior número de estudos que verificaram a redução dos teores das antocianinas durante a o processo de cocção, nomeadamente cozer feijão preto e cozer feijão de soja (redução de 93%) sendo que quanto mais intenso o tratamento térmico, maior a redução nas antocianinas. Além disso, Podsedek et al. (129) avaliaram as diferentes proporções de água em produtos hortícolas e o teor de antocianinas, tendo observado que quanto maior a proporção de água maior a perda de antocianinas, sendo que o método que apresentou menor efeito foi o método de cozer ao vapor.

#### *1.3.4.3 Efeitos das antocianinas na mitigação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos*

Conforme já descrito os processos de confeção apresentam benefícios e malefícios, como a formação de compostos com potencial carcinogénico (113).

De entre os compostos com potencial carcinogénico destacam-se os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), uma vez que são importantes contaminantes presente em determinados alimentos ricos em tecido muscular, como a carne e o peixe e que poderão ocorrer ao longo do processamento culinário. Estes compostos poderão ser formados através de processos e técnicas de processamento diferentes como assar, grelhar e defumagem. Contudo, o nível de PAHs depende de fatores como distância da fonte de calor, combustível utilizado, nível de processamento, duração e métodos de cozimento, enquanto processos como reutilização, concentração, esmagamento e armazenamento aumentam a quantidade de PAHs em alguns alimentos (130).

Os PAHs são compostos lipofílicos altamente hidrofóbicos e orgânicos com anéis aromáticos fundidos, principalmente de hidrogénio e átomos de carbono. Estes compostos são compostos tóxicos e relacionado com os carcinogénicos ambientais (131).

Os PAHs convertem-se em epóxidos que se ligam de forma covalente às macromoléculas celulares como o ADN, adicionando erros na replicação, mutação e génese tumoral, iniciando assim o cancro (132, 133). O número de anéis nestes compostos correlacionam-se positivamente com o nível de toxicidade. A maior concentração de PAHs é geralmente verificada em produtos defumados e grelhados a carvão (como carne gordurosa e produtos cárneos grelhados sob condições prolongadas ou severas), que contribuem significativamente para a ingestão diária desses compostos (134).



A acumulação de PAHs em carne grelhada no carvão pode resultar em três fontes possíveis: contaminação por fumo gerado pela combustão incompleta da fonte de calor que é trazido para a superfície do alimento; pirólise de matéria orgânica, como gordura, proteína e hidratos de carbono, diretamente na superfície do alimento; e, principalmente, pelo contacto de gotejamento de gordura nas brasas quentes (135, 136). Assim, os principais fatores que afetam as concentrações de PAHs na carne grelhada são a proximidade da fonte de calor, a quantidade de gordura no produto bruto e o tempo de cozimento (135, 136).

Tendo sido verificado por Viegas et al (137) um efeito inibitório da formação de PAHs em marinadas de cerveja, especialmente cerveja preta, sobre os PAHs com o aumento da eliminação da atividade dos radicais livre, a autora reforça que estratégias promissoras na mitigação PAHs poderão passar pela aplicação de compostos antioxidantes antes da confeção sob a forma de marinadas.

Estratégias de mitigação para reduzir a formação dos PAHs em carnes grelhadas foram propostas por vários autores como cozinhar a baixas temperaturas, usar de carvão de coco, reduzir da libertação de fumo e evitar gotejamento de gordura no carvão (135, 138).

Além destas estratégias, marinar a carne com produtos naturais, como especiarias e produtos hortícolas, como a cebola e o alho (139), marinar com cerveja (137), chá (140) e limão (141) podem ser utilizados, uma vez que foi evidenciado que a sua utilização promove a redução eficaz dos PAHs. Esta ação de redução da formação destes compostos poderá ser devida à presença de compostos fenólicos e à atividade antioxidante.

Efetivamente, os antioxidantes são conhecidos pela sua excelente capacidade para eliminar os radicais livres. Comparando a prevenção da produção de PAHs através de extrato de alecrim, de chá e de bambu, Gong, Zhao e Wu (142) verificaram que o bambu exibiu o melhor efeito inibitório na formação dos PAHs. Outros autores identificaram que o chá verde reduziu o conteúdo de PAHs em mais da metade em comparação com o controlo, propondo os autores que os 24 fenólicos identificados no chá podem inibir a formação de PAHs (143), estes autores verificaram a inibição da formação de PAH por marinadas de chá poderia ser atribuída aos compostos fenólicos abundantes na marinada.

Na literatura existente, há um número limitado de estudos sobre os efeitos dos compostos fenólicos puros na formação de PAHs. No entanto, alguns estudos revelaram os efeitos

dos compostos fenólicos na formação de outra classe de substâncias com potencial carcinogénico, a saber, aminas heterocíclicas (144).

Wang et al.(145) verificou que todos os compostos fenólicos foram eficazes na inibição da formação de PAHs. Consequentemente, estes autores propõem que os compostos fenólicos podem atuar como inibidores da formação de PAH podendo funcionar como “removedores” de radicais livres. Segundo Gong et al.(142), os antioxidantes naturais reduziram a concentração total de PAHs em até 30,3% (alecrim), 23,5% (chá) e 11,4% (bambu), , sugerindo que o efeito foi devido à eliminação de radicais livres pelos compostos fenólicos. Além disso, Büyükkurt et al. (146) mostraram que a redução da formação de PAHs durante a marinada de carne com extratos de sálvia e tomilho ricos em antioxidantes pode ser atribuída aos compostos fenólicos.

No que toca à influencia das antocianinas na formação dos PAHs, não foram identificados estudos que avaliassem esta influencia, contudo, marinar carne com vinho tinto reduziu a formação de aminas heterocíclicas (147), podendo especular-se que as antocianinas poderão influenciar esta redução e que o comportamento poderá ser semelhante nos PAHs. Para além disso, poderão os alimentos ricos nestes compostos ter um comportamento semelhante ao já identificado aos compostos fenólicos.

Assim, são escassos os estudos que avaliam a integração dos pequenos frutos em receitas tradicionais e o seu efeito no teor de antocianinas, bem como as potenciais vantagens destes alimentos na mitigação de formação de compostos com potencial carcinogénico, em especial nos PAHs.

## **CAPÍTULO II – ÂMBITO E OBJETIVOS**



São conhecidos os benefícios na saúde dos polifenóis, e em particular das antocianinas, sendo por esse motivo recomendada a ingestão de alimentos ricos nestes compostos, tais como a framboesa e a baga de sabugueiro. Contudo, estes alimentos têm uma durabilidade pequena, pelo que é frequente o seu congelamento como forma de conservação. Assim, a ingestão destes pequenos frutos poderá ocorrer em natureza ou sob a forma de produto processado.

O receituário tradicional português é rico em vários pratos que incorporam hortofrutícolas, utilização de marinadas de vinho para incorporação de sabores e que utilizam como meio de transferência de calor para a confeção dos alimentos a radiação. É frequente encontrar a utilização de frutos, ou seus derivados, na incorporação de receitas, quer em sobremesas quer em pratos principais, por exemplo: a) incorporação em bolos, tartes e compotas de frutos frescos ou congeladas; e b) utilização de derivados de frutos, como o vinagre de vinho ou de sidra para temperar carne ou peixe ou para utilizar em marinadas. No entanto, a utilização de frutos vermelhos apesar de se encontrar em crescimento ainda é limitada em Portugal.

Tendo em conta o leque alargado de frutos vermelhos existentes foram selecionados para o presente estudo a análise da framboesa e da baga de sabugueiro. A seleção destes dois pequenos frutos prendeu-se ao facto de ambos serem nativos na flora da península ibérica, para os quais se tem observado um aumento de produção, especialmente em Portugal, e pelo facto de terem na sua constituição antocianinas diferentes.

Por estas razões, o interesse dos portugueses na utilização destes pequenos frutos poderá ter aumentado, bem como a sua utilização nos mais variados processos de confeção.

Assim, foi pretensão do presente trabalho analisar o impacto dos processos de confeção domésticos no teor de antocianinas destes frutos e o efeito da matriz no teor de antocianinas tendo em conta a sua incorporação em sobremesas, como bolos e compotas.

Inspirada na utilização de derivados de frutos, como o vinagre, na culinária portuguesa como tempero, quer em alimentos para consumir em cru quer confecionados, foi ainda pretensão deste trabalho desenvolver um produto inovador à base de baga de sabugueiro e, conseqüentemente, rico em antocianinas, com o objetivo de avaliar o seu impacto na formação durante o processamento culinário de compostos com potencial carcinogénico como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.

Este projeto tem como objetivo geral compreender o impacto do processamento culinário na estabilidade das antocianinas de frutos vermelhos através da avaliação da composição em antocianinas antes e após o processamento culinário.

## **II.1. Objetivos Específicos**

**Objetivo 1** - Avaliar a composição em antocianinas de framboesa e de baga de sabugueiro antes e após o processamento culinário;

**Objetivo 2** - Conhecer o impacto das antocianinas de framboesa e de baga de sabugueiro em diferentes métodos culinário aplicados a receitas que tradicionalmente incluem estes frutos;

**Objetivo 3** – Desenvolver um tempero à base de baga de sabugueiro para utilização na culinária tradicional portuguesa e conhecer o impacto no teor de antocianinas;

**Objetivo 4** - Verificar o impacto da utilização de um tempero, à base de baga de sabugueiro, para temperar carne antes de grelhar, na redução da formação de PAHs.

**CAPÍTULO III – Anthocyanin content in raspberry and elderberry: effect of domestic cooking and recipe composition.**

### CAPÍTULO III

Anthocyanin content in raspberry and elderberry: effect of domestic cooking and recipe composition.



Para a concretização do objetivo 1 e 2 foi analisado o impacto de diferentes métodos de confeção e de diferentes matrizes alimentares no teor de antocianinas provenientes de framboesa e de bagas de sabugueiro quando incorporados em sobremesas.

Esta análise permite determinar qual o melhor método de confeção que poderá ser utilizado para preservar as antocianinas mantendo assim o benefício da sua ingestão, podendo auxiliar a escolha do consumidor no melhor método e a melhor receita que possa ser utilizada mantendo os benefícios da ingestão de pequenos frutos ricos em antocianinas.

***Anthocyanin content in raspberry and elderberry: effect  
of domestic cooking and recipe composition.***

*(submitted)*

**Anthocyanin content in raspberry and elderberry: effect of domestic cooking and recipe composition.**

Tânia CORDEIRO<sup>a</sup>, Iva FERNANDES<sup>b</sup>, Ana Faria<sup>d,e,f</sup>, Olívia PINHO<sup>a,c</sup>, Nuno MATEUS<sup>b</sup>, Conceição CALHAU<sup>d,e,f,g</sup>

a Faculty of Food and Nutrition of University of Porto

b REQUIMTE/LAQV, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

c REQUIMTE/LAQV, Department of Chemical Sciences, Laboratory of Bromatology and Hydrology, Faculty of Pharmacy of University of Porto, Portugal

d Nutrição e Metabolismo, NOVA Medical School, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal;

e Comprehensive Health Research Centre NOVA Medical School – FCM Universidade Nova de Lisboa, Campo Mártires da Pátria, 130 1169-056 Lisboa, Portugal

f CINTESIS - Center for Research in Health Technologies and Information Systems, Porto, Portugal

g Unidade Universitária Lifestyle Medicine José de Mello Saúde by NOVA Medical School

Corresponding author:

Conceição Calhau

NOVA Medical School – FCM Universidade Nova de Lisboa

Campo Mártires da Pátria, 130

1169-056 Lisboa, Portugal

e-mail: ana.faria@nms.unl.pt

tel:+351 21 8803033

fax:+351 21 8851920

### **Highlights**

- Defrost berries are more prone to present a decrease in the anthocyanin content after a cooking process.
- The recipe matrices and the cooking step may affect negatively the stability and accessibility of anthocyanins in fresh or defrost berries.
- Berries incorporation in mousse was the best way to preserve their anthocyanin content.

**Abstract**

The effect of domestic cooking methods (boiling, baking and steaming) and recipe composition on the content of anthocyanins present in raspberry and elderberry was investigated. Raspberries and elderberries were cooked either in a pan with water, in steam or baked in the oven. Four recipes containing raspberries and elderberries were prepared, namely: jam, crumble, muffin and mousse. The anthocyanin content of all samples was quantified by HPLC-DAD. Generally, and compared to raw raspberries, a reduction of anthocyanin content after cooking raspberries was observed, independently of the heating process. Defrost elderberries are more prone to decrease in anthocyanin content after cooking process. Berries anthocyanins content decreased more accentuated in jam. Altogether, recipe matrices and cooking may affect negatively the stability and accessibility of anthocyanins in fresh or defrost berries. Uncooked berries in recipes is the best way to preserve anthocyanin content.

**Keyword:** cooking, anthocyanin, raspberry, elderberry, recipes

## 1. Introduction

Phytochemicals are bioactive plant compounds generally classified as flavonoids, carotenoids, phenolic alkaloids, nitrogen-containing compounds or organosulfur compounds. Phytochemicals are found in fruits, vegetables, grains and other plant parts (Nebeling, 2003). Several studies have demonstrated that a high consumption of phytochemicals has a positive correlation with the prevention of various chronic diseases (Fiorentini, Zambonin, Dalla Sega, & Hrelia, 2015; Williams, Edwards, Hamernig, Jian, James, Johnson, et al., 2013) like cancer (Jolie Kiemlian, 2016; Metere & Giacomelli, 2017), chronic inflammation, cardiovascular diseases, diabetes (Bahadoran, Mirmiran, & Azizi, 2013; Rocha, Caldas, da Silva, Hermsdorff, & Alfenas, 2018), inflammatory bowel disease (Martin & Bolling, 2015) and neurological diseases (Ishwarya & Narendhirakannan, 2016).

Anthocyanins are flavonoids responsible for the red, purple and blue colour of several fruits (Bhagwat, Haytowitz, Wasswa-Kintu, & Holden, 2013; Fang, 2015) like raspberry and elderberry (Fang, 2015) and many vegetables (Bhagwat, Haytowitz, Wasswa-Kintu, & Holden, 2013). The anthocyanins more commonly identified in raspberry species are Cyanidin-3-sophoroside, Cyanidin-3-glucoside, Cyandin-3-rutinoside, Cyanidin-3-glucoside-rutinoside (Määttä-Riihinen, Kamal-Eldin, & Törrönen, 2004) and those identified in elderberry are Cyanidin-3-glucoside, Cyanidin-3-sambubiose, Cyanidin-3-sambubiose-5-glucoside (Lee & Finn, 2007; Wu, Gu, Prior, & McKay, 2004). Anthocyanins have distinguishing physicochemical properties that confer them their unique colour. They are extremely reactive molecules and thus sensitive to degradation reactions with oxygen, temperature, light, enzymes or pH being some of the factors that can affect anthocyanins stability and colour (Iva Fernandes, Faria, Calhau, de Freitas, & Mateus, 2014). Structurally, anthocyanins may occur in different structural forms in aqueous solution depending on the pH, which influences their colour: at a pH lower than 3, anthocyanins occur as a flavylium cation form that presents an orange or red colour. The storage environment plays a critical role in maintaining anthocyanin pigmentation and temperature is known to promote anthocyanin degradation (Abdel-Aal & Hucl, 2003). Thus, anthocyanins may be degraded through numerous processes occurring during food processing, storage and extraction (Brouillard & Dubois, 1977; Brouillard & Lang, 1990).

Cooking is a process that promotes both physical and chemical changes in food. The application of various cooking methods provides food with unique characteristics either in a sensory level or in a nutritional level. Therefore, the process of cooking improves the process of digestibility of foods and, in general, improves the bioaccessibility and consequently the bioavailability of various nutrients (Hotz & Gibson, 2007) and promotes food safety by reducing the load of microorganisms (Manios & Skandamis, 2015). However, cooking may also promote the loss of various nutrients, particularly antioxidants, iron, folic acid, aminoacids, among others (Gray, Conklin, Todorov, & Kasko, 2016; Song, Park, Jung, Lee, Gim, Ka, et al., 2015; Vinha, Alves, Barreira, Costa, & Oliveira, 2015), and the production of undesirable compounds such as several carcinogenic compounds (Pfau, Martin, Cole, Venitt, Phillips, Grover, et al., 1999; Stavic, 1994).

Given the recent relevance of the ingestion of small fruits like raspberry and elderberry on human health (Noratto, Chew, & Atienza, 2017), due to the presence of anthocyanins in these food sources, health professionals recommend their consumption. The intake of these small fruits is, most of the time, in fresh and raw forms, but several desserts may incorporate them to enrich the antioxidant content and, at the same time, reduce the amount of sugar. It is therefore important to understand whether the content of these compounds is kept after the application of cooking processes such as boiling, steaming and baking and after their incorporation in recipes like jam and cakes.

Few studies have evaluated the impact of domestic cooking methods on small fruits. Previous studies showed that when fruits are cooked, changes in physical and chemical compositions occur compared to the raw form (Queiroz, Oliveira, Pinho, & Ferreira, 2009). Oliveira et al. (Oliveira, Amaro, Pinho, & Ferreira, 2010) quantified the anthocyanin content from cooked blueberry and found a progressive heating degradation effect on the anthocyanin content, but cooked blueberries maintained or increased radical-scavenging activity. Another study found that the anthocyanin content of blueberries decreased during cooking, proofing and baking (Rodriguez-Mateos, Cifuentes-Gomez, George, & Spencer, 2014). However, the impact of cooking methods on the anthocyanin content of raspberry and elderberry is unknown, as well as the effect of berries incorporation in different recipes.

Therefore, the present study aims at evaluating the effects of different cooking methods and the effect of different food matrices on the anthocyanin content of raspberry and elderberry.

## **2. Material and Methods**

### **2.1 Sample preparation**

#### **2.1.1 Cooking methods**

Raspberries were obtained from a local and rural farmer in Mirandela, Portugal on the second week of July, and refrigerated at 5 °C during two days before the study. Elderberries were obtained from a rural farmer in Oliveira de Azeméis, Portugal, on the second week of August, then frozen at -18°C during four months before the study. In both cases, plants with good solar exposition were selected. A sample of 50 g of fresh raspberry and defrost elderberries were cooked in a pan with water (50 mL) for 5 minutes at 100°C, cooked in steam (50 mL of water) for 5 minutes at 100°C and baked in the oven for 5 minutes at 180°C. All cooking methods were performed in triplicate.

#### **2.1.2 Preparation of desserts**

Four desserts with different cooking process, different utilization and different temperatures were prepared: jam, crumble, muffin and mousse. Table 2 shows the time, temperature and ingredients of each dessert recipe. All recipes were performed in triplicate. Prior to this investigation, the cooking times of these dessert recipes were tested and raspberries and elderberries had different cooking time than crumble and muffin, as indicated in Table 1.

Table 1. Time, temperature and ingredients of each dessert recipe.

Cooking method	Cooking condition		
	Temperature	Time	Ingredient
Jam	100 °C	10 min	25 g of sugar 50 g of raspberry/elderberry
		20 min	10 g of brown sugar 10 g of white flour 6.25 g of butter 50 g of raspberry
Crumble	180 °C	10 min	10 g of brown sugar 10 g of white flour 6.25 g of butter 50 g of elderberry
		20 min	50 g of sugar 30 g of butter 10 mL of water, 55 g of egg 2 g of baking powder (Disodium diphosphate, sodium bicarbonate) 50 g of raspberry
Muffin	180 °C	10 min	50 g of sugar 30 g of butter 10 mL of water, 55 g of egg 2 g of baking powder (Disodium diphosphate, sodium bicarbonate) 50 g of elderberry
		5 °C	1.5 g of colourless gelatine 17.5 g of egg white 62 g of condensed milk 50 g of raspberry/elderberry



All recipes were prepared based on the recipe, so for the muffin were followed the steps: adding eggs, sugar and butter by beating vigorously, then adding flour and baking powder, and mixing. Finally, add fruit juice (10g of fruit and 10 ml of water) to the dough. Mix everything and add whole fruits to the dough by stirring carefully. For the crumble mix the flour with the butter and part of the sugar, then put the fruit into the oven for 5 or 10 minutes, finally add the dough in pieces and bake for more 5 or 10 minutes.

## **2.2 Extraction of anthocyanin from berries**

After the domestic cooking 5 g from each cooked sample were acidified with 1 mL of HCl 2 % (v/v) and conserved at 5 °C during 12 hours before analysis. Anthocyanins were extracted with 10 mL of methanol. After 15 minutes in a laboratory shaker each sample was centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes and the supernatant was used for the HPLC analysis.

## **2.3 Anthocyanin quantification by HPLC-DAD**

High-performance liquid chromatography (Dionex Ultimate Thermo Scientific® Standard 3000) was performed to analyse anthocyanin content. A reversed- phase C18 column (LiChrospher® 100 RP -18, 5 µm, 25 cm) at 25°C, equipped with a security guard column, was used to separate the anthocyanins. Anthocyanins were eluted with a gradient system consisting of ultra-purified water and formic acid (9:1 v/v) as solvent A and water, formic acid and acetonitrile (6:1:3 v/v/v) as solvent B at a flow rate of 1.0 mL.min<sup>-1</sup> and run time of 52 minutes. The column temperature was maintained at 25°C and the injection volume was 50 µL. The gradient system was 80% solvent A and 20% solvent B for 42.5 min, 40% solvent A and 60% solvent B from 42.5 to 46.2 min and 100% solvent B from 46.2 to 52 minutes. After each run the column was stabilized at the initial conditions (20 % solvent B and 80 % solvent A) for 10 minutes (I. Fernandes, Nave, Goncalves, de Freitas, & Mateus, 2012). Quantitative analyses were carried out with an external calibration curve and expressed as cyanidin-3-glucoside equivalents. All analyses were performed in triplicate.

## **2.4 Mass Spectrometry analysis**

LC-MS analysis was performed on a liquid chromatograph (Hewlett-Packard 1100 series) equipped with an AQUATM (Phenomenex, Torance, CA, USA) reversed-phase column (150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m, C18), thermostatted at 35°C. Solvents were A: H<sub>2</sub>O/HCOOH (9.9:0.1) and B: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/HCOOH (6.9:3:0.1). The HPLC gradient used was the same reported above for the HPLC analysis. Double online detection was done in a photodiode spectrophotometer and by mass spectrometry. The mass detector was a Finnigan LCQ (Finnigan Corporation, San Jose, USA) equipped with an API source, using an electrospray ionisation (ESI) interface. Both the auxiliary and the sheath gas were a mixture of nitrogen and helium. The capillary voltage was 3 V and the capillary temperature 190 °C. Spectra were recorded in positive ion mode between *m/z* 120 and 1500. The mass spectrometer was programmed to perform a series of three scans: a full mass, a zoom scan of the most intense ion in the first scan, and a MS-MS of the most intense ion using relative collision energies of 30 and 60.

## 2.5 Statistical analysis

All data was expressed as mean  $\pm$  SEM from triplicates of two independent experiments. One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test were performed using GraphPad Prism version 7.00 (GraphPad Software, San Diego California USA). Statistical significance was considered when  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Anthocyanin characterization in raspberries by LC-MS

The anthocyanin HPLC profile of the raspberry sample is presented Fig. 1. In total, 5 peaks were identified as indicated in Table 2. Peak 1, 3 and 5 yielded a fragment ion with an *m/z* of 287 [M]<sup>+</sup> and were hence assigned as cyanidin glycosides was found for these 3 peaks. Peak 2 revealed a fragment ion with an *m/z* of 611 [M]<sup>+</sup> and was hence assigned as Cyanidin-3-(2-glucosylrutinoside). In a similar way, pelargonidin-3-sophoroside was assigned for peak 4.

Table 2– Identification of anthocyanins present in fresh raspberry sample by LC-MS.

Peak	RT (min)	Compound	M <sup>+</sup> (m/z)	Main fragment ions (m/z)
1	26.83	Cyanidin-3-sophoroside	611	287
2	27.94	Cyanidin-3-(2-glucosylrutinoside)	757	611
3	30.03	Cyanidin-3-glucoside	449	287
4	30.67	Pelargonidin-3-sophoroside	595	271
5	31.79	Cyanidin-3-rutinoside	595	287

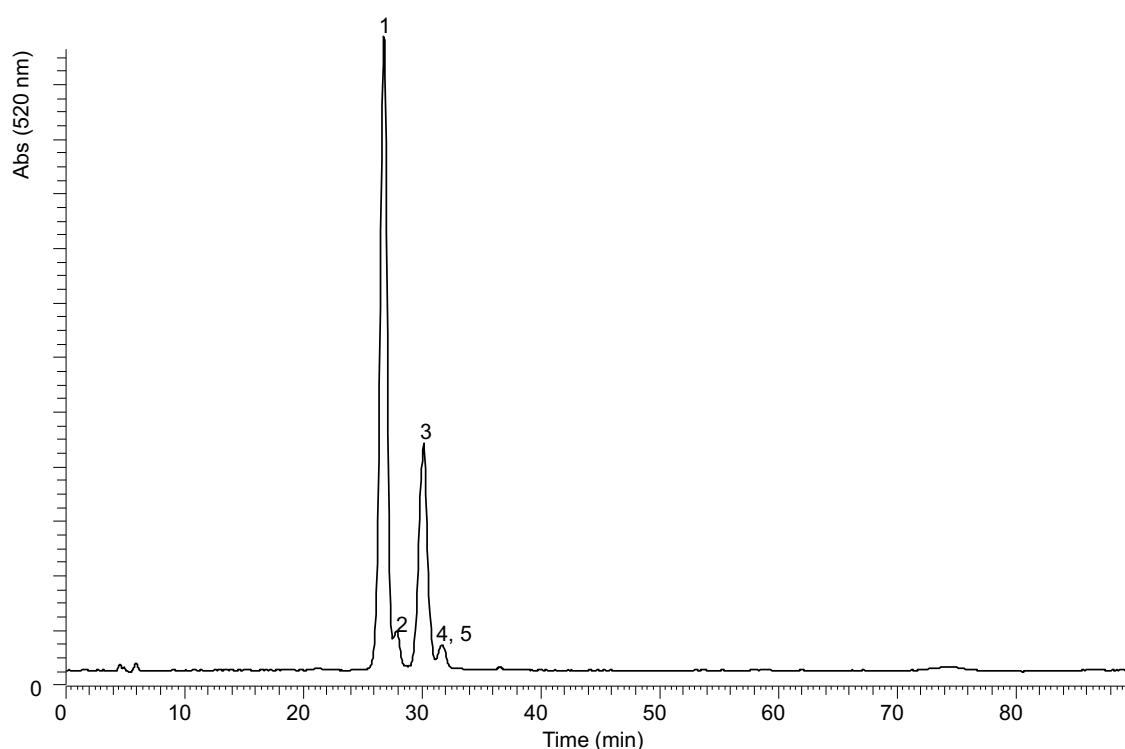


Figure 1 – HPLC chromatogram of fresh raspberry (peak numbers correspond to those reported in Table 3) recorded at 520 nm.

### 3.2. Anthocyanin characterization in elderberries by LC-MS

The anthocyanin HPLC profile of the elderberry sample is presented in Fig. 2. Four peaks were identified as described in Table 3. Peak 1 and 2 were assigned as cyanidin-3,5-diglucoside and cyanidin-3-sambubiose-5-glucoside; peaks 3 and 4 were identified as cyanidin-3-sambubiose and cyanidin-3-glucoside, respectively.

Table 3 – Identification of anthocyanins present in defrost elderberry sample by LC-MS.

Peak	RT (min)	Compound	M <sup>+</sup> (m/z)	Fragment ions (m/z)
1	21.87	Cyanidin-3,5-diglucoside	611	449; 287
2	21.99	Cyanidin-3-sambubiose-5-glucoside	743	449; 287
3	30.25	Cyanidin-3-sambubiose	581	287
4	30.80	Cyanidin-3-glucoside	449	287

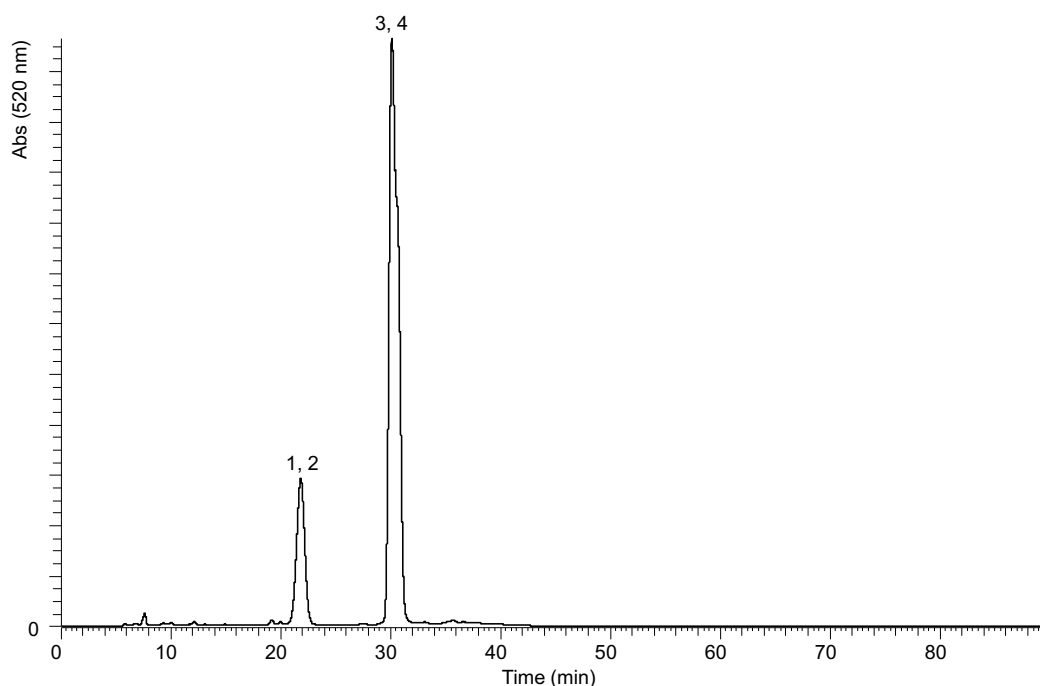
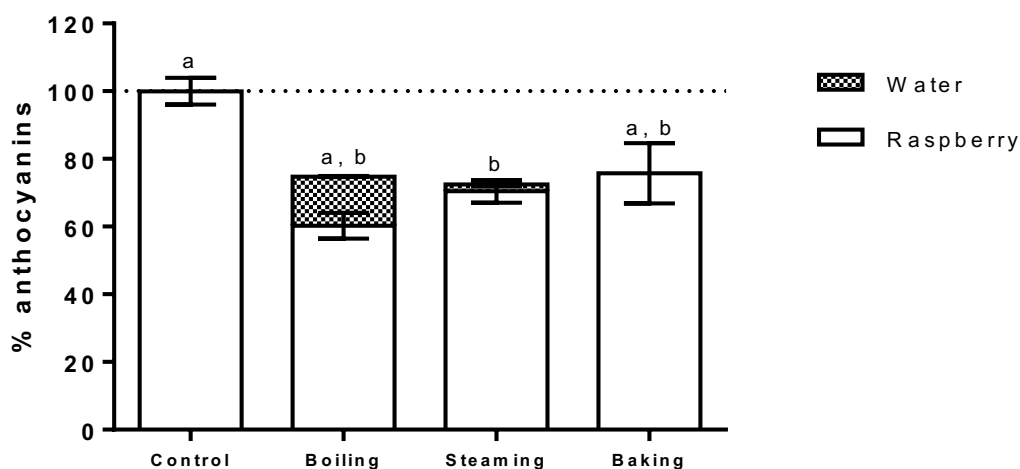


Figure 2 - HPLC chromatogram of anthocyanins present in defrost elderberry (peak numbers correspond to those reported in Table 3) recorded at 520 nm.

### 3.3. Changes in anthocyanin content after cooking

Changes in the anthocyanin content initially present in raspberries were evaluated for different cooking methods and different dessert recipes. The total loss in anthocyanin content was around 40 % for boiling, 30 % for steaming and 28 % for baking. However, anthocyanin losses in boiling and steaming methods are smaller when their content in the boiling water (~15%) and in the steaming water (~2%) are taken into consideration (Fig. 3A).

A)



B)

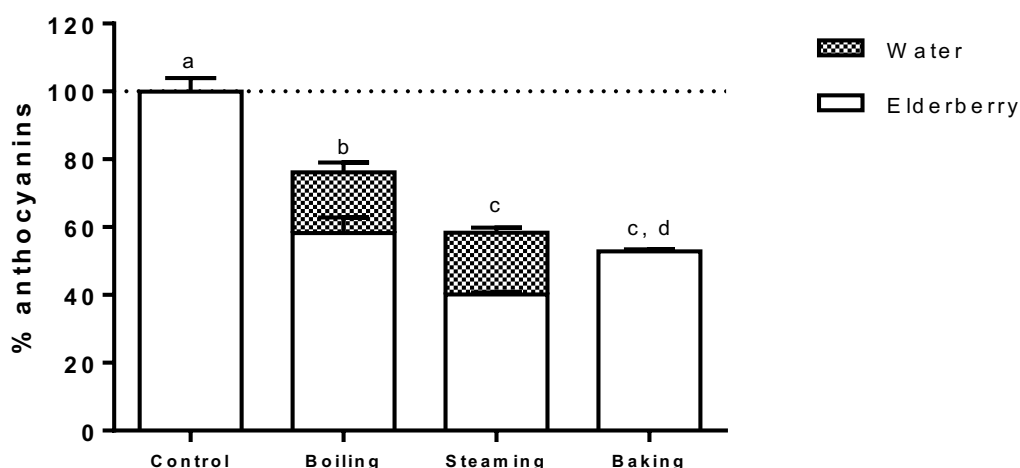


Figure 3. HPLC quantification of anthocyanin content in A) raspberries and B) elderberries after cooking methods. Columns with different letters represent results in which the difference between the means is statistically significant  $p < 0.05$ .

In the case of elderberries, the total loss in anthocyanin content was around 45 % for boiling, 60 % for steaming and 35 % for baking (Fig. 3B). However and as already referred in the case of raspberries, the anthocyanin losses in boiling and steaming are

smaller when the content present in the boiling water (20 %) and steaming water (20 %) are considered.

#### **3.4. Changes in anthocyanin content in the dessert recipes**

For raspberries, the recipes that revealed the most anthocyanin loss were jam and muffin (at least 70 %,  $p < 0.05$ ), followed by crumble (at least 35 %,  $p < 0.05$ ) and mousse (at least 25 %,  $p > 0.05$ ) (Fig. 4A). On the other hand, for elderberries, the dessert recipe with greater loss of anthocyanin was jam (60 %), followed by muffin (35 %), crumble (35 %) and mousse (10 %) (Fig. 4B).

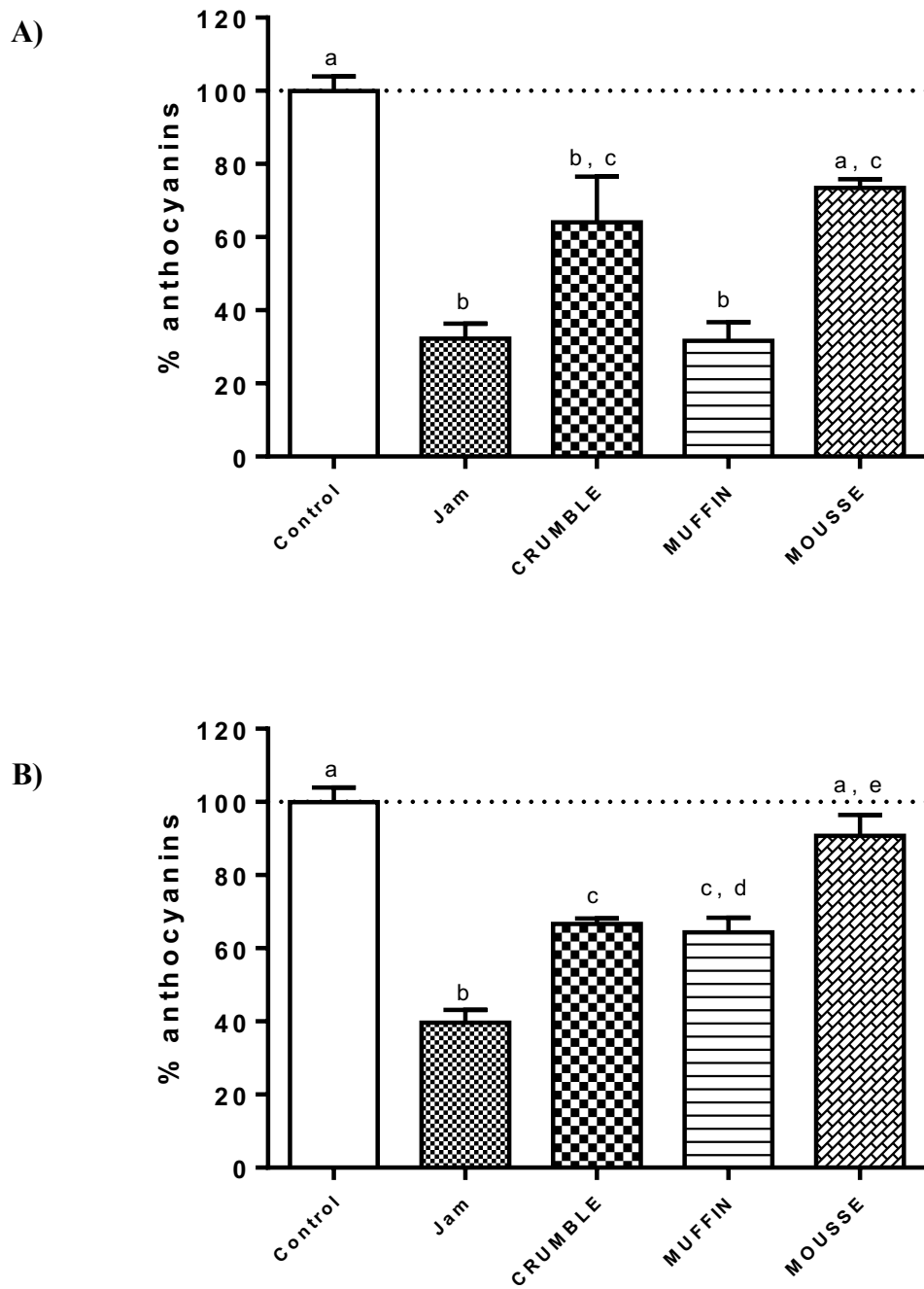


Figure 4. HPLC quantification of anthocyanin content in dessert recipes using A) raspberries and B) elderberries. Columns with different letters represent results in which the difference between the means is statistically significant,  $p < 0.05$ .

## 4. Discussion

### 4.1. Effect of domestic cooking on the anthocyanin content

To avoid the effect of exposure time to the various temperatures of the cooking processes, in the present study all processes occurred with equal cooking times, varying only temperature. In the present study a retention of 60 % was observed when elderberries were cooked in water for 5 minutes. However, when the content of the cooking water is considered, the retention increases up to 80 %. The magnitude of the loss observed in the present study and in the previous referred study may result from different exposure times to the heat source. There are only few studies that analyze the effect of cooking on small fruits: a study was carried out to evaluate the anthocyanin content in cooked blueberries in the belly of a fish, verifying a reduction of anthocyanin content (Oliveira, Amaro, Pinho, & Ferreira, 2010). On the other hand, Lachman et al. (Lachman, Hamouz, Musilová, Hejtmánková, Kotíková, Pazderů, et al., 2013) have verified an increase in the anthocyanin content after boiling in water or steaming potatoes, while Xu & Xang (B. Xu & Chang, 2009) have verified a reduction of the anthocyanin content in black beans. In the present study, either in raspberries or in elderberries there was a reduction of the anthocyanin content, in average of 30 %. It has been reported that high temperature induces the degradation of these compounds (Aramwit, Bang, & Srichana, 2010; Mourtzinou, Makris, Yannakopoulou, Kalogeropoulos, Michali, & Karathanos, 2008). Therefore, time and temperature may influence their content depending on the cooking method used. What can also justify the reduction of anthocyanins in the cooking methods studied is the fact that these compounds are highly soluble, so they may be lost to the water by leaching (Blessington, Nzaramba, Scheuring, Hale, Reddivari, & Miller, 2010; Baojun Xu & Chang, 2008). In this study, 20 % of the anthocyanin content was found in the boiling water for both fruits. Also, the steam water contained about 10-20 % of anthocyanins, which may demonstrate the leaching of these compounds also to the steam water and by condensation. On the other hand, it has been described that temperature, and consequently the cooking processes turn cellular walls softer, breaking them, which may facilitate the release of compounds from inside the cells (Blessington, Nzaramba, Scheuring, Hale, Reddivari, & Miller, 2010). This could be the reason for the increased concentration verified by other authors (Lachman, et al., 2013). Therefore, cooking processes can distinctly influence the anthocyanin content present in food (Bernhardt &



Schlich, 2006; D. Murador, Braga, Da Cunha, & De Rosso, 2018; Wachtel-Galor, Wong, & Benzie, 2008).

Regarding baking, a reduction in the anthocyanin content was found in the present study, oppositely to what was reported by several authors who observed an increase in the concentration of these compounds (D. C. Murador, da Cunha, & de Rosso, 2014). This increase may be related to the baking technique, where the heat transfer to cooking food occurs through the air, which will induce a dehydration and consequently the increase of the anthocyanin concentration. On the other hand, the present process uses a higher temperature (180 °C) compared to other processes such as boiling (100 °C). This difference may result in a decrease in the leaching of the anthocyanins to the cooking water.

#### **4.2. Effect of matrix of recipe composition on the anthocyanin content**

According to this study, jam was the processing that induced a greater loss of anthocyanins in both small fruits (60 %). These results are in accordance with other studies that evaluated the impact of jam production on the anthocyanin content (Merve, Gamze, Dilek, D, Jules, & Esra, 2017). This can be explained by the complex network that is created in the process of cooking jam, the sugars and pectin naturally present in these fruits and the addition of refined sugar, which interacts with water under high temperature, and the affinity of anthocyanins to sugars. These facts can imprison anthocyanins in complex networks that hence render them inaccessible to methanol extraction (A. Fernandes, Ivanova, Brás, Mateus, Ramos, Rangel, et al., 2014).

Muffin was the second dessert recipe that revealed the largest anthocyanin content decrease. Elderberries and raspberries had different behavior since elderberry muffin showed the smallest loss of anthocyanins. Several studies have observed the impact of baking culinary processing in red fruit muffins, having observed results identical to those obtained in this work, with losses approximately to 20 % (Jian, E, & M, 2011; Rodriguez-Mateos, Cifuentes-Gomez, George, & Spencer, 2014). However, a study carried out in muffin with baking purple wheat verified a total loss of anthocyanins (W. Li, Pickard, & Beta, 2007). However, this latter study differed in the type of leavening used, which could therefore justify the different results found in the investigation. Rosales-Soto et al (Rosales-Soto, Powers, & Alldredge, 2012) used a baking powder with double action and

that contained yeast, while these two studies with greater losses of anthocyanin used sodium bicarbonate (W. Li, Pickard, & Beta, 2007) and baking powder (Rupasinghe, Wang, Huber, & Pitts, 2008). It has been suggested that fermentation agents can drastically affect the polyphenols content of baking products, with baking soda producing the greatest loss on the polyphenols content (Stahl, Miller, Apgar, Sweigart, Stuart, McHale, et al., 2009). In fact, it has been reported that baking soda and baking powder may induce alkalinity and consequently induce the loss of flavonoids and the decrease of antioxidant activity (Stahl, et al., 2009). However, addition of citric acid may increase the stability of the anthocyanins, reducing the loss of these compounds due to a pH reduction (J. Li, Walker, & Faubion, 2011). In this study, sodium bicarbonate was used, which may have promoted the reduction of the anthocyanins in the muffins. The difference in content between raspberry and elderberry muffins may be due to the fact that the first one was baked for 20 minutes and the second for 10 minutes. The justification for these results may be the effect of the time providing greater retention of anthocyanins and the effect the alkalization.

Like the dessert raspberry muffin and elderberry muffin, the dessert raspberry crumble and elderberry crumble had a different anthocyanin loss, 65% ( $p < 0.05$ ) and 35%, respectively. These differences can be explained by the same justification for the muffin's dessert.

The culinary processes that originated the least loss of anthocyanins was the mousse, which would be expected since this dessert is not subjected to any cooking process involving high temperature. However, losses of about 10% were found, which could be related to the refrigeration storage and to the imprisonment of these compounds in the food matrix, particularly fat and sugar present in the condensed milk.

## **5. Conclusion**

All domestic cooking methods tested in the present study led to a loss of the original anthocyanin content. Frozen berries seem to be more prone to degradation by heat, although more than 50 % of anthocyanin content remains independently of the heat source. Even though, this seems to be a good alternative to include anthocyanins in a daily meal for consumers that have not easy access to fresh berries. On the other hand, berries

incorporated in the recipes, showed a decrease in the anthocyanin content that was more pronounced in the jam > muffin > crumble > mousse.

## 6 References

Abdel-Aal, E.-S. M., & Hucl, P. (2003). Composition and Stability of Anthocyanins in Blue-Grained Wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2174-2180.

Aramwit, P., Bang, N., & Srichana, T. (2010). The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits. *Food Research International*, 43(4), 1093-1097.

Bahadoran, Z., Mirmiran, P., & Azizi, F. (2013). Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *J Diabetes Metab Disord*, 12(1), 43.

Bernhardt, S., & Schlich, E. (2006). Impact of different cooking methods on food quality: Retention of lipophilic vitamins in fresh and frozen vegetables. *Journal of Food Engineering*, 77(2), 327-333.

Bhagwat, S., Haytowitz, D. B., Wasswa-Kintu, S. I., & Holden, J. M. (2013). USDA Develops a Database for Flavonoids to Assess Dietary Intakes. *Procedia Food Science*, 2, 81-86.

Blessington, T., Nzaramba, M. N., Scheuring, D. C., Hale, A. L., Reddivari, L., & Miller, J. C. (2010). Cooking Methods and Storage Treatments of Potato: Effects on Carotenoids, Antioxidant Activity, and Phenolics. *American Journal of Potato Research*, 87(6), 479-491.

Brouillard, R., & Dubois, J.-E. (1977). Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *Journal of the American Chemical Society*, 99(5), 1359-1364.

Brouillard, R., & Lang, J. (1990). The hemiacetal–cis-chalcone equilibrium of malvin, a natural anthocyanin. *Canadian Journal of Chemistry*, 68(5), 755-761.

Fang, J. (2015). Classification of fruits based on anthocyanin types and relevance to their health effects. *Nutrition*, 31(11), 1301-1306.

Fernandes, A., Ivanova, G., Brás, N. F., Mateus, N., Ramos, M. J., Rangel, M., & de Freitas, V. (2014). Structural characterization of inclusion complexes between cyanidin-3-O-glucoside and  $\beta$ -cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers*, 102, 269-277.

Fernandes, I., Faria, A., Calhau, C., de Freitas, V., & Mateus, N. (2014). Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Functional Foods*, 7, 54-66.

Fernandes, I., Nave, F., Goncalves, R., de Freitas, V., & Mateus, N. (2012). On the bioavailability of flavanols and anthocyanins: flavanol-anthocyanin dimers. *Food Chem*, 135(2), 812-818.

Fiorentini, D., Zambonin, L., Dalla Sega, F. V., & Hrelia, S. (2015). Polyphenols as Modulators of Aquaporin Family in Health and Disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 196914.

Gray, P. J., Conklin, S. D., Todorov, T. I., & Kasko, S. M. (2016). Cooking rice in excess water reduces both arsenic and enriched vitamins in the cooked grain. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 33(1), 78-85.

Hotz, C., & Gibson, R. S. (2007). Traditional Food-Processing and Preparation Practices to Enhance the Bioavailability of Micronutrients in Plant-Based Diets. *The Journal of Nutrition*, 137(4), 1097-1100.

Jian, L., E, W. C., & M, F. J. (2011). Acidulant and oven type affect total anthocyanin content of blue corn cookies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(1), 38-43.

Jolie Kiemlian, K. (2016). Yin and Yang of Polyphenols in Cancer Prevention: A Short Review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 16(7), 832-840.

Lachman, J., Hamouz, K., Musilová, J., Hejtmánková, K., Kotíková, Z., Pazderů, K., Domkářová, J., Pivec, V., & Cimr, J. (2013). Effect of peeling and three cooking methods on the content of selected phytochemicals in potato tubers with various colour of flesh. *Food Chem*, 138(2), 1189-1197.

Lee, J., & Finn, C. E. (2007). Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(14), 2665-2675.

Li, J., Walker, C. E., & Faubion, J. M. (2011). Acidulant and oven type affect total anthocyanin content of blue corn cookies. *J Sci Food Agric*, 91(1), 38-43.

Li, W., Pickard, M. D., & Beta, T. (2007). Effect of thermal processing on antioxidant properties of purple wheat bran. *Food Chem*, 104(3), 1080-1086.

Määttä-Riihinen, K. R., Kamal-Eldin, A., & Törrönen, A. R. (2004). Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Berries of *Fragaria* and *Rubus* Species (Family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6178-6187.

Manios, S. G., & Skandamis, P. N. (2015). Effect of frozen storage, different thawing methods and cooking processes on the survival of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 in commercially shaped beef patties. *Meat Sci*, 101, 25-32.

Martin, D. A., & Bolling, B. W. (2015). A review of the efficacy of dietary polyphenols in experimental models of inflammatory bowel diseases. *Food & Function*, 6(6), 1773-1786.

Merve, T., Gamze, T., Dilek, B., D, H. R., Jules, B., & Esra, C. (2017). Processing black mulberry into jam: effects on antioxidant potential and in vitro bioaccessibility. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(10), 3106-3113.

Metere, A., & Giacomelli, L. (2017). Absorption, metabolism and protective role of fruits and vegetables polyphenols against gastric cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 21(24), 5850-5858.

Mourtzinos, I., Makris, D. P., Yannakopoulou, K., Kalogeropoulos, N., Michali, I., & Karathanos, V. T. (2008). Thermal Stability of Anthocyanin Extract of *Hibiscus sabdariffa* L. in the Presence of  $\beta$ -Cyclodextrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10303-10310.

Murador, D., Braga, A. R., Da Cunha, D., & De Rosso, V. (2018). Alterations in phenolic compound levels and antioxidant activity in response to cooking technique effects: A meta-analytic investigation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(2), 169-177.

Murador, D. C., da Cunha, D. T., & de Rosso, V. V. (2014). Effects of cooking techniques on vegetable pigments: A meta-analytic approach to carotenoid and anthocyanin levels. *Food Research International*, 65, 177-183.

Nebeling, L. (2003). Phytochemicals in nutrition and health. *Academy of Nutrition and Dietetics*, 103, 786.

Noratto, G. D., Chew, B. P., & Atienza, L. M. (2017). Red raspberry (*Rubus idaeus* L.) intake decreases oxidative stress in obese diabetic (db/db) mice. *Food Chem*, 227, 305-314.

- Oliveira, C., Amaro, L. F., Pinho, O., & Ferreira, I. M. (2010). Cooked blueberries: anthocyanin and anthocyanidin degradation and their radical-scavenging activity. *J Agric Food Chem*, 58(16), 9006-9012.
- Pfau, W., Martin, F. L., Cole, K. J., Venitt, S., Phillips, D. H., Grover, P. L., & Marquardt, H. (1999). Heterocyclic aromatic amines induce DNA strand breaks and cell transformation. *Carcinogenesis*, 20(4), 545-551.
- Queiroz, F., Oliveira, C., Pinho, O., & Ferreira, I. M. (2009). Degradation of anthocyanins and anthocyanidins in blueberry jams/stuffed fish. *J Agric Food Chem*, 57(22), 10712-10717.
- Rocha, D., Caldas, A., da Silva, B., Hermsdorff, H., & Alfenas, R. (2018). Effects of blueberry and cranberry consumption on type 2 diabetes glycemic control: a systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 00-00.
- Rodriguez-Mateos, A., Cifuentes-Gomez, T., George, T. W., & Spencer, J. P. E. (2014). Impact of Cooking, Proving, and Baking on the (Poly)phenol Content of Wild Blueberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 3979-3986.
- Rosales-Soto, M. U., Powers, J. R., & Alldredge, J. R. (2012). Effect of mixing time, freeze-drying and baking on phenolics, anthocyanins and antioxidant capacity of raspberry juice during processing of muffins. *J Sci Food Agric*, 92(7), 1511-1518.
- Rupasinghe, H. P. V., Wang, L., Huber, G. M., & Pitts, N. L. (2008). Effect of baking on dietary fibre and phenolics of muffins incorporated with apple skin powder. *Food Chem*, 107(3), 1217-1224.
- Sadilova, E., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2006). Thermal Degradation of Acylated and Nonacylated Anthocyanins. *Journal of Food Science*, 71(8), C504-C512.
- Song, J., Park, J., Jung, J., Lee, C., Gim, S. Y., Ka, H., Yi, B., Kim, M. J., Kim, C. I., & Lee, J. (2015). Analysis of Trans Fat in Edible Oils with Cooking Process. *Toxicol Res*, 31(3), 307-312.
- Stahl, L., Miller, K. B., Apgar, J., Sweigart, D. S., Stuart, D. A., McHale, N., Ou, B., Kondo, M., & Hurst, W. J. (2009). Preservation of cocoa antioxidant activity, total polyphenols, flavan-3-ols, and procyanidin content in foods prepared with cocoa powder. *J Food Sci*, 74(6), C456-461.

- Stavric, B. (1994). Biological significance of trace levels of mutagenic heterocyclic aromatic amines in human diet: a critical review. *Food Chem Toxicol*, 32(10), 977-994.
- Vinha, A. F., Alves, R. C., Barreira, S. V., Costa, A. S., & Oliveira, M. B. (2015). Impact of boiling on phytochemicals and antioxidant activity of green vegetables consumed in the Mediterranean diet. *Food Funct*, 6(4), 1157-1163.
- Wachtel-Galor, S., Wong, K. W., & Benzie, I. F. F. (2008). The effect of cooking on Brassica vegetables. *Food Chem*, 110(3), 706-710.
- Williams, D. J., Edwards, D., Hamernig, I., Jian, L., James, A. P., Johnson, S. K., & Tapsell, L. C. (2013). Vegetables containing phytochemicals with potential anti-obesity properties: A review. *Food Research International*, 52(1), 323-333.
- Wu, X., Gu, L., Prior, R. L., & McKay, S. (2004). Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and Their Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7846-7856.
- Xu, B., & Chang, S. K. (2009). Total Phenolic, Phenolic Acid, Anthocyanin, Flavan-3-ol, and Flavonol Profiles and Antioxidant Properties of Pinto and Black Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as Affected by Thermal Processing. *J Agric Food Chem*, 57(11), 4754-4764.
- Xu, B., & Chang, S. K. C. (2008). Effect of soaking, boiling, and steaming on total phenolic content and antioxidant activities of cool season food legumes. *Food Chem*, 110(1), 1-13.

## CAPÍTULO IV

Evaluation of anthocyanin index in different stage in industrial production of elderberry vinegar



## **CAPÍTULO IV – Evaluation of anthocyanin index in different stage in industrial production of elderberry vinegar**

## CAPÍTULO IV

Evaluation of anthocyanin index in different stage in industrial production of elderberry vinegar

Após a compreensão do impacto que os processos de confeção e a matriz alimentar têm no teor de antocianinas, e tendo em consideração os hábitos culinários portugueses, foi desenvolvido um produto inovador utilizando um fruto vermelho, fonte de antocianinas. Assim, para a concretização do objetivo 3 foi desenvolvido um vinagre de baga de sabugueiro e foi realizado um estudo exploratório sobre o impacto que cada uma das fases inerentes ao desenvolvimento deste produto tiveram no teor das antocianinas, e assim, poder ser utilizado como tempero na culinária portuguesa.

***Evaluation of anthocyanin index in different stage in  
industrial production of elderberry vinegar***

*(submitted)*

## **Evaluation of anthocyanin index in different stages of industrial production of elderberry vinegar**

Tânia Cordeiro<sup>a</sup>, Iva Fernandes<sup>b</sup>, Olga Viegas<sup>a,c</sup>, João M. M. Ferreira<sup>d</sup>, Olívia Pinho<sup>a,c</sup>, Nuno Mateus<sup>b</sup>, Conceição Calhau<sup>e, f</sup>

a Faculty of Food and Nutrition of University of Porto

b REQUIMTE/LAQV, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

c REQUIMTE/LAQV, Department of Chemical Sciences, Laboratory of Bromatology and Hydrology, Faculty of Pharmacy of University of Porto, Portugal

d Mendes Gonçalves SA

e Nutrição e Metabolismo, NOVA Medical School, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal;

f Comprehensive Health Research Centre NOVA Medical School – FCM Universidade Nova de Lisboa, Campo Mártires da Pátria, 130 1169-056 Lisboa, Portugal

Corresponding author:

Conceição Calhau

NOVA Medical School – FCM Universidade Nova de Lisboa

Campo Mártires da Pátria, 130

1169-056 Lisboa, Portugal

e-mail: ana.faria@nms.unl.pt

tel:+351 21 8803033

fax:+351 21 8851920

## Highlights

- The industrial process of elderberry vinegar promotes the loss of anthocyanins, essentially during acetic fermentation.
- The anthocyanin content of elderberry vinegar remains high.
- Elderberry vinegar remains a good source of anthocyanins.

**Abstract**

Anthocyanins are one of the main classes of polyphenolic compounds in elderberry, accounting for several health benefits. The aim of this work is to evaluate the impact of different fermentation processes of vinegar production on the anthocyanin content. The elderberry vinegar was produced by using submerged fermentation. The anthocyanin content of all samples was quantified by HPLC-DAD. Four anthocyanins were identified in the initial berry juice, and were also present after the alcoholic fermentation and after the acetic fermentation. An increase in the content of anthocyanins was found after the alcoholic fermentation whereas a loss after the acetic fermentation was found, with the greatest negative impact on the Cyanidin-3-sambubiose and Cyanidin-3-glucoside.

Industrial production of vinegar affect the anthocyanin content, however its content remains higher. Elderberry may be regarded as a good choice for the production of vinegar rich in anthocyanin.

**Keyword**

Elderberry, vinegar, anthocyanin, health

## 1. Introduction

Elderberry is considered an important source of phytochemicals, especially anthocyanins. Although this fruit is widely used as a by-product, there are currently available include this by-product to processed food (Martins, Pinho, & Ferreira, 2017). It has been proposed that fermentation processes may increase the bioaccessibility of the polyphenolic compounds by their release from their matrix (Acosta-Estrada, Gutierrez-Uribe, & Serna-Saldivar, 2014).

It is known that anthocyanins are unstable compounds, and their stability is affected by various processes, namely by the type of processing, time, shelf life and temperature (Clifford, 2000). These factors can induce various chemical and enzymatic reactions that will produce modifications in their chemical structure (Cavalcanti, Santos, & Meireles, 2011). In fact, changes in anthocyanin during winemaking and vinegar processing were studied in depth. For example, pyranoanthocyanins constitute one of the most important classes of anthocyanin-derived pigments that occur naturally in red wine (de Freitas & Mateus, 2011; Oliveira et al., 2010). In addition, it has been found that anthocyanins at acidic pH are more stable during processing and storage (Giusti & Wrolstad, 2003; Kamiloglu, Pasli, Ozcelik, Van Camp, & Capanoglu, 2015).

Ubeda et al.(Ubeda et al., 2013) found a decrease in total anthocyanins after the alcoholic and acetic fermentation process of strawberry and Klopotek et al.(Klopotek, Otto, & Bohm, 2005) also showed a loss of total anthocyanins when comparing strawberry wort with strawberry wine.

However, there is very limited information about the individual composition of anthocyanin in elderberry-based vinegars. Consequently, it is relevant to obtain knowledge about the characterization of anthocyanins in these products to understand the effect of fermentation in this class of bioactive compounds, which in turn play a beneficial role in human health.

The traditional manufacture of the different vinegars occurs according to the ancestral techniques. The historical and geographical success of vinegars can occur due to the low technology involved and the variety of raw materials that can be used. As most vinegars are cheap and easy to produce, their scientific and technological evolution has been slow over the years. However, it is crucial to increase scientific knowledge, improve

production technology and implement higher standards of quality and safety for the global increasing market (Solieri & Giudici, 2009).

The objective of this work is to characterize the individual composition of anthocyanins in the various fermentation steps during the industrial manufacture of elderberry vinegar.

## **2. Material and methods**

### *2.1. Sample*

Elderberries were obtained from a rural farmer in Oliveira de Azeméis, Portugal, on the second week of August of 2017, from integrated agriculture and the trees with the best sun exposure were selected. Elderberries were dried in the traditional sunshine during the month of August for three days at a temperature of 22 °C and the berries were mixed three times a day to optimize the drying of all the berries, the moisture was 16.1%.

### *2.2 Elderberry pulp preparation*

The elderberry pulp (EP) was prepared to be viable for the production of vinegar. The EP was prepared using 15 kg of dried berry and taking into account its moisture, it was hydrated with 27 kg of water. It was blended to a volume of 30 L and ground using an industrial fruit grinder, subsequently 5 ml peptinases of the brand Peptinex Ultracolor Novoenzymes were added.

### *2.3 Vinegar production*

The vinegar was produced by a food industry company using the methodology used by it for the production of vinegar, that is, the submerged fermentation having followed the procedure described (Emde, 2014). The experimental reactor was Cetotec SF6. After the rehydration of the dried berry, 0.3 g/L of EC1118 yeast were added to the fruit juice in order to perform the alcoholic fermentation. As the alcoholic fermentation ended, the fermented elderberry juice was fed to the acetic fermentation reator (Acetator), converting the previously formed ethanol into acetic acid. This stage was performed at 30°C. At the end of the process the elderberry vinegar was filtered. The process of production of elderberry vinegar began on July 23, the stage of the alcoholic fermentation was add 0.3



g/L of EC1118 (Lallemand/Proenol), and ended on August 20 and the phase of the acetic fermentation ended on August 27, and each cycle was 20 hour. At the end of the process the elderberry vinegar was filtered.

#### *2.4 Determination of anthocyanin content*

##### *2.4.1 Preparation of the sample*

At the end of each phase a 70 g samples of EP after alcoholic fermentation (EPAF), elderberry vinegar not filtered (EVnF) and elderberry vinegar filtered (EVF) were collected and 5 ml of pure glacial acetic acid was added and then frozen at -18 ° C and stored for one month.

##### *2.4.2 Anthocyanin quantification by HPLC-DAD*

High-performance liquid chromatography (Dionex Ultimate Thermo Scientific® Standard 3000) was performed to analyse anthocyanin content. A reversed-phase C18 column (LiChrospher® 100 RP -18, 5 µm, 25 cm) at 25°C, equipped with a security guard column, was used to separate the anthocyanins. Anthocyanins were eluted with a gradient system consisting of ultra-purified water and formic acid (9:1 v/v) as solvent A and water, formic acid and acetonitrile (6:1:3 v/v/v) as solvent B at a flow rate of 1.0 mL.min<sup>-1</sup> and run time of 52 minutes. The column temperature was maintained at 25°C and the injection volume was 50 µL. The gradient system was 80% solvent A and 20% solvent B for 42.5 min, 40% solvent A and 60% solvent B from 42.5 to 46.2 min and 100% solvent B from 46.2 to 52 minutes. After each run the column was stabilized at the initial conditions (20 % solvent B and 80 % solvent A) for 10 minutes (Fernandes, Nave, Goncalves, de Freitas, & Mateus, 2012). Quantitative analyses were carried out with an external calibration curve and expressed as cyanidin-3-glucoside equivalents.

##### *2.4.3 Mass Spectrometry analysis*

LC-MS analysis was performed on a liquid chromatograph (Hewlett-Packard 1100 series) equipped with an AQUATM (Phenomenex, Torance, CA, USA) reversed-phase column (150 x 4.6 mm, 5 µm, C18), thermostatted at 35°C. Solvents were A: H<sub>2</sub>O/HCOOH (9.9:0.1) and B: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/HCOOH (6.9:3:0.1). The HPLC gradient used was the

same reported above for the HPLC analysis. Double online detection was done in a photodiode spectrophotometer and by mass spectrometry. The mass detector was a Finnigan LCQ (Finnigan Corporation, San Jose, USA) equipped with an API source, using an electrospray ionisation (ESI) interface. Both the auxiliary and the sheath gas were a mixture of nitrogen and helium. The capillary voltage was 3 V and the capillary temperature 190 °C. Spectra were recorded in positive ion mode between  $m/z$  120 and 1500. The mass spectrometer was programmed to perform a series of three scans: a full mass, a zoom scan of the most intense ion in the first scan, and a MS-MS of the most intense ion using relative collision energies of 30 and 60.

### 3. Results

#### 3.1. Anthocyanin characterization in elderberries by LC-MS

The anthocyanin HPLC profile of the EP is presented in Fig. 1. Two peaks were identified as described in Table 1. The first one was assigned as cyanidin-3,5-diglucoside (1) and cyanidin-3-sambubiose-5-glucoside (2) and The second one 2 was identified as cyanidin-3-sambubiose (3) and cyanidin-3-glucoside (4), respectively.

**Table 1** – Identification of anthocyanins present in elderberry sample by LC-MS.

Peak	RT (min)	Compound	$M^+$ ( $m/z$ )	Fragment ions ( $m/z$ )
1	21.87	Cyanidin-3,5-diglucoside	611	449; 287
2	21.99	Cyanidin-3-sambubiose-5-glucoside	743	449; 287
3	30.25	Cyanidin-3-sambubiose	581	287
4	30.80	Cyanidin-3-glucoside	449	287

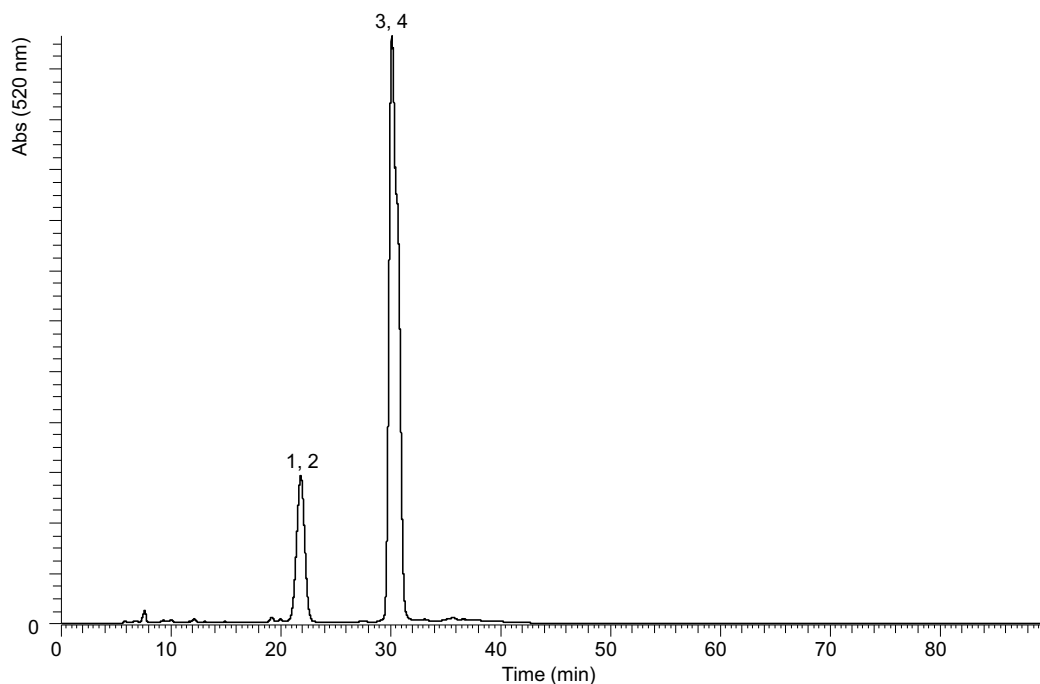


Figure 1 - HPLC chromatogram of anthocyanins present in elderberry (peak numbers correspond to those reported in Table 1) recorded at 520 nm.

### 3.2. Changes in anthocyanin content after vinegar production

Changes in the anthocyanin content initially present in EP were evaluated for different vinegar stages, as shown in table 2. The anthocyanin content in EP increased after alcoholic fermentation. However, anthocyanin losses were observed after acetic fermentation. Cyanidin-3-sambubiose plus cyanidin-3-glucoside were the anthocyanins that were affected after acetic fermentation in EVF. On the other hand, cyanidin-3,5-diglucoside plus cyanidin-3-sambubiose-5-glucoside were the least affected by acetic fermentation.

**Table 2** - Anthocyanin concentrations (mg/mL) in elderberry pulp (EP) elderberry pulp after alcoholic fermentation (EPAF), and elderberry vinegar filtered (EVF)

Sample	Anthocyanin	Concentration /mg ml <sup>-1</sup>
EP	Cyanidin-3,5-diglucoside + Cyanidin-3-sambubiose-5-glucoside	0.102
	Cyanidin-3-sambubiose + Cyanidin-3-glucoside	0.095
EPAF	Cyanidin-3,5-diglucoside + Cyanidin-3-sambubiose-5-glucoside	0.105
	Cyanidin-3-sambubiose + Cyanidin-glucoside	0.087
EVF	Cyanidin-3,5-diglucoside + Cyanidin-3-sambubiose-5-glucoside	0.103
	Cyanidin-3-sambubiose + Cyanidin-3-glucoside	0.080

#### 4. Discussion

The total of anthocyanin content increase after alcoholic fermentation process, and the higher losses at the end of the vinegar production due to the acetic fermentation. The anthocyanins with the greatest concentration in samples were: cyanidin-3-sambubiose, cyanidin-glucoside, cyanidin-3,5-diglucoside and cyanidin-3-sambubiose-5-glucoside, as already identified by other authors (Petrut et al., 2017).

Hornedo-Ortega et al. (Hornedo-Ortega et al., 2017) determined the influence of the fermentative processes on the content of anthocyanins in the manufacture of strawberry vinegar, cyanidin 3-glycoside was found to be the anthocyanin with the highest loss. The slight increase in some anthocyanins content after the alcoholic fermentation can be due to the fact that the alcoholic fermentation occurs at a temperature of 25°C which can lead to the breakage of the cell walls and induce the release of anthocyanins (Clifford, 2000). Also, the added peptidases may have caused the pectin binding to break down and may aid in the process of releasing the compounds into the cells (Gao, Fangel, Willats, Vivier, & Moore, 2016).

Regarding the acetic fermentation, there was a decrease in the content of anthocyanins compared to the content of EP. When analyzed the impact of the process on the identified anthocyanins, it was verified that the anthocyanins most affected by the acetic

fermentation process were cyanidin-3-sambubiose and cyanidin-glucoside with a loss of 15% in the EVF, respectively. It is known that anthocyanins become more stable during processing than other natural pigments (Giusti & Wrolstad, 2003). Another possible explanation for the decrease in anthocyanin compounds may be the adsorption mechanism between yeast and anthocyanins, which has been shown to be responsible for the decrease of these compounds in alcoholic fermented products (Morata et al., 2003). Acetic fermentation decreased anthocyanin concentration to a greater extent. It is known that micro-oxygenation is a common practice aimed at improving color stability and controlling the reactivity of wine polyphenols (Mateus, de Pascual-Teresa, Rivas-Gonzalo, Santos-Buelga, & de Freitas, 2002). Probably, the high loss of anthocyanins after acetic fermentation may be related to the oxidation process that occurs in a medium with this amount of oxygen.

The effect of oxygen exposure on the anthocyanin profile of wine was studied under micro-oxygenation conditions (Cerezo, Cuevas, Winterhalter, Carmen Garcia-Parrilla, & Troncoso, 2010). It has been demonstrated that micro-oxygenation increases the formation of vitisin-like compounds (Cano-López, Pardo-Minguez, López-Roca, & Gómez-Plaza, 2006) and ethyl 3-glycoside-ethyl-catechin (Cano-López et al., 2006). On the other hand, anthocyanins and their acylated derivatives decrease over time and even more under microoxygenation conditions due to the formation of anthocyanin-derived compounds and degradation reactions (Cano-López et al., 2006).

Although there was a decrease in anthocyanin content in the production of elderberry vinegar the losses were only 10%, especially in cyanidin-3-sambubiose and cyanidin-3-glucoside, which indicates that the fermentative processes of elderberry vinegar production may not significantly influence the loss of anthocyanins, thus maintaining their beneficial health characteristics.

## **5. Conclusion**

The industrial production of elderberry vinegar affected anthocyanin content, being the acetic fermentation produced higher losses. In addition, Cyanidin-3,5-diglucoside and Cyanidin-3-sambubiose-5-glucoside were the compounds which showed less loss during this process.

## 6. References

- Acosta-Estrada, B. A., Gutierrez-Uribe, J. A., & Serna-Saldivar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chem*, 152, 46-55. doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.093
- Cano-López, M., Pardo-Minguez, F., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2006). Effect of microoxygenation on anthocyanin and derived pigment content and chromatic characteristics of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 325-331.
- Cavalcanti, R. N., Santos, D. T., & Meireles, M. A. A. (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. *Food Research International*, 44(2), 499-509. doi:10.1016/j.foodres.2010.12.007
- Cerezo, A. B., Cuevas, E., Winterhalter, P., Carmen Garcia-Parrilla, M., & Troncoso, A. M. (2010). Anthocyanin composition in Cabernet Sauvignon red wine vinegar obtained by submerged acetification. *Food Research International*, 43(6), 1577-1584. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.006
- Clifford, M. N. (2000). Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1063-1072. doi:10.1002/(sici)1097-0010(20000515)80:7<1063::Aid-jsfa605>3.0.Co;2-q
- de Freitas, V., & Mateus, N. (2011). Formation of pyranoanthocyanins in red wines: a new and diverse class of anthocyanin derivatives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(5), 1463-1473. doi:10.1007/s00216-010-4479-9
- Emde, F. (2014). Vinegar Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.
- Fernandes, I., Nave, F., Goncalves, R., de Freitas, V., & Mateus, N. (2012). On the bioavailability of flavanols and anthocyanins: flavanol-anthocyanin dimers. *Food Chem*, 135(2), 812-818. doi:10.1016/j.foodchem.2012.05.037
- Gao, Y., Fangel, J. U., Willats, W. G. T., Vivier, M. A., & Moore, J. P. (2016). Effect of Commercial Enzymes on Berry Cell Wall Deconstruction in the Context of Intravineyard Ripeness Variation under Winemaking Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(19), 3862-3872. doi:10.1021/acs.jafc.6b00917

Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3), 217-225. doi:10.1016/s1369-703x(02)00221-8

Hornedo-Ortega, R., Álvarez-Fernández, M. A., Cerezo, A. B., Garcia-Garcia, I., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. (2017). Influence of Fermentation Process on the Anthocyanin Composition of Wine and Vinegar Elaborated from Strawberry. *Journal of Food Science*, 82(2), 364-372. doi:doi:10.1111/1750-3841.13624

Kamiloglu, S., Pasli, A. A., Ozcelik, B., Van Camp, J., & Capanoglu, E. (2015). Colour retention, anthocyanin stability and antioxidant capacity in black carrot (*Daucus carota*) jams and marmalades: Effect of processing, storage conditions and in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 13, 1-10. doi:10.1016/j.jff.2014.12.021

Klopotek, Y., Otto, K., & Bohm, V. (2005). Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5640-5646. doi:10.1021/jf047947v

Martins, Z. E., Pinho, O., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2017). Fortification of Wheat Bread with Agroindustry By-Products: Statistical Methods for Sensory Preference Evaluation and Correlation with Color and Crumb Structure. *Journal of Food Science*, 82(9), 2183-2191. doi:doi:10.1111/1750-3841.13837

Mateus, N., de Pascual-Teresa, S., Rivas-Gonzalo, J. C., Santos-Buelga, C., & de Freitas, V. (2002). Structural diversity of anthocyanin-derived pigments in port wines. *Food Chem*, 76(3), 335-342. doi:10.1016/s0308-8146(01)00281-3

Morata, A., Gomez-Cordoves, M. C., Suberviola, J., Bartolome, B., Colomo, B., & Suarez, J. A. (2003). Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14), 4084-4088. doi:10.1021/jf021134u

Oliveira, J., Azevedo, J., Silva, A. M. S., Teixeira, N., Cruz, L., Mateus, N., & de Freitas, V. (2010). Pyranoanthocyanin Dimers: A New Family of Turquoise Blue Anthocyanin-Derived Pigments Found in Port Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5154-5159. doi:10.1021/jf9044414

Petrut, G. S., Muste, S., Muresan, C., Paucean, A., Muresan, A. E., & Nagy, M. (2017). Chemical Profiles and Antioxidant Activity of Black Elder (*Sambucus Nigra* L.) - A Review. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca-Food Science and Technology*, 74(1), 9-16. doi:10.15835/buasvmcn-fst:11591

Solieri, L., & Giudici, P. (2009). *Vinegars of the World* (pp. 1-16): Springer.

Ubeda, C., Callejon, R. M., Hidalgo, C., Torija, M. J., Troncoso, A. M., & Morales, M. L. (2013). Employment of different processes for the production of strawberry vinegars: Effects on antioxidant activity, total phenols and monomeric anthocyanins. *Lwt-Food Science and Technology*, 52(2), 139-145. doi:10.1016/j.lwt.2012.04.021



## **CAPÍTULO V – Effect of different vinegars on the Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Charcoal-Grilled Pork**



No estudo seguinte foi pretensão analisar o impacto da utilização do vinagre de baga de sabugueiro na mitigação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, compostos com potencial carcinogénico, conseguindo assim concretizar o objetivo 4 do presente trabalho. Tendo em conta que os temperos e as marinadas são hábito da culinária portuguesa, pretendeu-se assim simular de forma fidedigna a utilização de temperos de vinagre em lombo de porco grelhado em carvão e a sua ação na formação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.

## **Effect of different vinegars on the Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Charcoal- Grilled Pork**

*(submitted)*

## **Effect of vinegars on the Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Charcoal-Grilled Pork**

Tânia CORDEIRO<sup>a</sup>, Olga, VIEGAS<sup>a,b</sup>, Marta SILVA<sup>b</sup>, Zita MARTINS<sup>b</sup>, Iva FERNANDES<sup>c</sup>, Isabel M.L.P.V.O. FERREIRA<sup>b</sup>, Olívia PINHO<sup>a,b</sup>, Nuno MATEUS<sup>c</sup>, Conceição CALHAU<sup>d,e</sup>

<sup>a</sup> Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

<sup>b</sup> REQUIMTE/LAQV, Laboratório de Bromatologia e Hidrologia, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, Portugal

<sup>c</sup> REQUIMTE/LAQV, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal

<sup>d</sup> Nutrição e Metabolismo, NOVA Medical School, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal

<sup>e</sup> CINTESIS, Center for Health Technology Services Research, Porto, Portugal

**Abstract**

The effect of seasoning meat with different types of vinegar on the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in charcoal-grilled pork was evaluated and compared with the formation of these compounds in no-seasoning meat. Elderberry vinegar exhibited the highest amount of anthocyanin content followed by red wine vinegar and fruit vinegar with raspberry juice. Control and seasoning vinegar meat samples contained the four PAHs named PAH4 by the EFSA and classified as suitable indicators for carcinogenic potency of PAHs in food, however control and blank vinegar contain more than was established by EFSA ( $>30 \text{ ng g}^{-1}$ ). Elderberry vinegar showed the highest inhibitory effect in the formation of PAH4 (82%), followed by white wine vinegar (79%), red wine vinegar and cider vinegar (66% both) and fruit vinegar with raspberry juice (55%). The total phenolic content and antioxidant activity had a significantly moderated negative correlation with PAH4 formation. The elderberry vinegar, with a higher phenolic content and antioxidant activity, was the vinegar more effective to reduce PAH4, but the white wine vinegar had a similar response to reduction of PAH4. All vinegars empowered the reduction of formation of PAH during processing and household cooking of pork loin, so the use of seasoning with vinegar rich in phenolic compounds, should be encouraged to reduce exposure to these carcinogenic compounds.

**Keywords:** vinegar, anthocyanin, polycyclic aromatic hydrocarbons, pork loin, elderberry, red wine, white wine, cider

## Introduction

Portugal has a strong gastronomic tradition based on various types of cooking processes and use of different ingredients. Vinegar is usually used for the seasoning of meat with the purpose of assigning flavor and also tenderize meat, through protein proteolysis (Żochowska-Kujawska, Kotowicz, Lachowicz, & Sobczak, 2017), rendering the meat a higher digestibility (Patel & Welham, 2013), and also improves microbiological quality and safety of meat (Laranjo, et al., 2019). It was also recently demonstrated that vinegar also extend the shelf-life and improves the quality of Portuguese traditional ready-to-eat meat product (Laranjo, et al., 2019).

The application of the various methods of cooking promote changes in muscle foods, which provides unique characteristics both at the sensory and nutritional levels. Thus, food processing improves the food digestibility, the bioavailability of nutrients and promotes the hygieno-sanitary safety of food, notably in reducing the burden of microorganisms. On the other hand, domestic cooking may cause the loss of various nutrients, namely antioxidants, iron, vitamins, among others, and can promote the formation of undesirable compounds, such as the heat generated carcinogens (Sobral, Cunha, Faria, & Ferreira, 2018).

IARC (Bouvard, et al., 2015) classified the consumption of processed meat as “carcinogenic to humans” (Group 1). Within the chemical carcinogens formed on meat cooked over a heated surface or open flames, both heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) stand out (Bouvard, et al., 2015). Regarding PAHs, the European Food Safety Authority (EFSA) also concluded that the most appropriate indicator for the occurrence and carcinogenic potency of PAHs in food is the sum of the four specific substances (PAH4): benz[a]anthracene (BaA), chrysene (Ch), benzo[b]fluoranthene (BbA) and benzo[a]pyrene (BaP) (EFSA, 2008). Therefore, the European Commission established maximum levels of PAH4 in meat that has undergone grilling or barbecuing, being 5 and 30 ng g<sup>-1</sup> for BaP and PAH4, respectively (European Commission, 2011).

The presence of PAHs in grilled and barbecued meats may arise from three sources: smoke contamination from the heat source; pyrolysis of the organic matter on the food surface; and mainly due to the dripping of fat to the hot coals resulting in generation of

smoke carrying PAHs that deposit on food surface (Chung, et al., 2011; Rose, et al., 2015; Viegas, Novo, Pinto, Pinho, & Ferreira, 2012).

Exposure to PAHs should be as low as reasonable achievable (EFSA, 2008), therefore recommendations to reduce their formation have been proposed, such as the use of lower cooking temperatures, use of coconut charcoal, reduction of smoke release and dripping of fat, wrap the meat, and the reuse of charcoal (EFSA, 2008; Farhadian, Jinap, Hanifah, & Zaidul, 2011; Viegas, et al., 2012). Moreover, mitigation strategies involving natural products such as spices, beverages and plant extracts (Farhadian, Jinap, Faridah, & Zaidul, 2012; Garcia-Lomillo, Viegas, Gonzalez-SanJose, & Ferreira, 2017; Janoszka, 2011; Viegas, Yebra-Pimentel, Martinez-Carballo, Simal-Gandara, & Ferreira, 2014; C. Wang, et al., 2018) such as meat marinades or seasoning have been proposed. The presence of phenolic compounds or other elements with free-radical scavenging activity have been pointed out as the responsible from the inhibitory mechanism.

Nowadays, one of the most important trends in the food industry is the use and valorization of natural sources of antioxidant compounds. It was recently demonstrated that a red wine pomace seasoning, rich in phenolic compounds, namely anthocyanins, inhibits the formation of cooking PAHs in barbecued patties (Garcia-Lomillo, et al., 2017). Among the food sources of polyphenols, elderberry (*Sambucus nigra*) stands out for its richness in anthocyanins, which contribute to its high antioxidant capacity (Mikulic-Petkovsek, et al., 2014; Seabra, Braga, Batista, & de Sousa, 2010) and makes this berry of high interest in the production and nutritional enrichment of juices, jams and powders (Mikulic-Petkovsek, et al., 2014).

Vinegar is an inexpensive natural additive, fermented product, with several active compounds such as organic acids, polyphenols (H. Chen, Chen, Giudici, & Chen, 2016). Therefore, the purpose of this study was to evaluate the effect of different commercial vinegars on the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons in charcoal grilled pork loin. Moreover, the higher potential inhibitory of anthocyanin rich vinegars was also explored.

## Materials and Methods

### Sample preparation

Six different vinegars were tested: white wine vinegar (WWV), red wine vinegar (RWV), apple cider vinegar (ACV) elderberry vinegar (EV), apple cider vinegar with raspberry juice (RJV). All vinegars were from the same company, and were acquired in a local supermarket in Porto, except EV that was cordially prepared by the company using the same industrial process (submerged fermentation). In order to despite the potential effect of acetic acid, a blank vinegar (BV) was prepared with 5% acetic acid.

Pork loin steaks with similar dimensions (0.75 cm thick) and weight (about 40 g each) were obtained from a local supermarket in Porto, Portugal. 24 Steaks were used: four independent samples for each vinegar treatment and control (unseasoned). All vinegars were put in spray bottles in order to spread the vinegar homogeneously into the meat surface. To cover the entire meat surface, five sprays were dispensed in each side, which represents 1 g of vinegar per steak (25 mg of vinegar per gram of meat) immediately before the cooking process. No other ingredients were added, besides vinegar.

### Cooking Conditions

Pork loin steaks were cooked in disposable charcoal barbecues and the fire was ignited according the manufactures instructions. Samples were cooked directly on the disposable barbecue and the cooking temperatures (around 200 °C) were assessed using a thermometer Crison 638 Pt (Barcelona, Spain). During barbecuing (10 min) the inner temperature of steaks was monitored and samples were turned once at 5 min. Different samples were cooked in independent disposable barbecues.

Raw and cooked pork loin steaks were weighted and the cooking losses were calculated. Each grilled pork steak was mixed with a knife mill (Grindomix GM 200, Retsh, Hann, Germany) to obtain a uniform, representative, and homogeneous sample. After moisture determination, all samples were frozen until PAHs analysis.

### Reagents and Standards

PAH Calibration Mix containing 10 µg mL<sup>-1</sup> of sixteen PAHs, including the studied PAH4 (BaA, Ch, BbF, BaP), was supplied by Supelco (47940-U, Bellefonte, PA, USA).



Tryphenylene from Sigma (purity  $\geq 98\%$ ) was used as internal standard (IS) of PAHs extraction at  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  in acetonitrile. All the solvents used for PAHs and anthocyanin analysis were of HPLC grade (Merck, Darmstadt, Germany) and water was purified using a Milli-Q System (Millipore, Bedford, MA, USA).

Concerning the spectrophotometric analysis: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), FeCl<sub>3</sub>, Trolox, , were purchased from Sigma–Aldrich (Madrid, Spain). 2,4,6-Tripyridyl-s-triazine (TPTZ), Folin–Ciocalteu reagent and gallic acid were provided by Fluka, Switzerland. Glacial acetic acid and HCl was provided by Carlo Erba, Italy.

## **2.3. PAHs Analysis**

### **2.3.1. PAHs Extraction**

Acetonitrile-based extraction of PAHs was performed according the Silva et al. (Silva, et al., 2018) methodology. Briefly, 5 g of sample, with 20  $\mu\text{L}$  of IS and 5 mL of purified water was mixed in a 50-mL centrifuge tube. The mixture was vortexed for 1 min, after which 5 mL of acetonitrile were added and shaken vigorously by hand. Afterwards, 2.5 g anhydrous magnesium sulfate and 2.5 g sodium chloride were added, followed by shaking and centrifugation at 4000 rpm for 5 min. Then, 2 mL of the upper layer acetonitrile extract were evaporated to dryness under nitrogen stream at room temperature. The residue was dissolved in 100  $\mu\text{L}$  of acetonitrile and 20  $\mu\text{L}$  injected into the HPLC-FLD.

### **2.3.2. HPLC-FLD Conditions**

A HPLC unit (Jasco, Japan) equipped with one PU-1580 HPLC pump, an AS-950 auto sampler with a 20- $\mu\text{L}$  loop and a FP-920 fluorescence detector were used. The system was controlled by Borwin PDA Controller Software (JMBS Developments, Le Fontanil, France). The column was a C18 Supelcosil LC-PAH (25 cm length; 4.6 mm internal diameter, 5- $\mu\text{m}$  particle size) (Supelco, Bellefonte, PA, USA) thermostated at 32 °C. Gradient elution and fluorescence detection excitation/emission program were set up according to the method described by Viegas et al. (Viegas, et al., 2012). The detection for IP had a gain tenfold higher than for the other PAHs.

The identification criteria for PAHs were based on retention times and on co-elution with standards. For quantification matrix-match calibration curves were used according Silva et al. (Silva, et al., 2018).

## **2.4. Phenolic and antioxidant activity of vinegars**

### **2.4.1. Antioxidant capacity**

#### **2.4.1.1. Radical scavenging assay (DPPH)**

Radical scavenging assays were performed using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) as a free radical, according to the method described in the literature (Bondet, Brand-Williams, & Berset, 1997) with some modifications. The assays were conducted in a microplate reader (Biotek Powerwave XS with software KC4). The scavenging reaction was carried out on 96 plate wells at 25 °C. 270 µL of DPPH solution (60 µM in methanol) was added in each well together with 30 µL of compound. The compounds tested were at a final concentration of 10 µM. The decrease in absorbance was measured at 515 nm, at  $t = 0$  and every 5 min, for 20 min. For the final results, the 0–20 min reaction time range was used. Antiradical activity was expressed as µM Trolox equivalents. The antiradical activity was calculated from the equation determined from a linear regression after plotting known solutions of Trolox at different concentrations.

#### **2.4.1.2. Ferric reducing antioxidant power (FRAP)**

The FRAP assay was performed following the method described in the literature (Benzie & Strain, 1996) with some modifications. This method consists in the reduction of ferric tripyridyltriazine complex  $[\text{Fe}(\text{III})-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$  to ferrous tripyridyltriazine complex  $[\text{Fe}(\text{II})-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$  by an antioxidant. The resulting product has a  $\lambda$  maximum at 593 nm, which can be measured by spectrophotometry. Its formation will thus reflect the reductive capacity of the antioxidant. The reaction was performed in a microplate reader (Biotek Powerwave XS with software KC4). The reaction was carried out on 96 well plates at 37 °C. FRAP reagent (10 vol of 300 mM acetate buffer, pH 3.6 + 1 vol of 10 mM TPTZ in 40 mM HCl + 1 vol of 20 mM  $\text{FeCl}_3$ ) was diluted to one-third with acetate buffer. 270 µL of this solution was added in each well together with 30 µL of compound. The blank assay was performed using 270 µL of FRAP reagent and 30 µL of methanol.

The compounds were dissolved in methanol and used in a final concentration of 10  $\mu\text{M}$ . The absorbance at 593 nm was measured in time 0 and 4 min. The results were expressed as Trolox equivalents.

#### **2.4.2. Total phenolic content determination**

The total phenolic content of the extracts was determined following the Folin–Ciocalteu method adjusted to a microscale (Arnous, Makris, & Kefalas, 2001). For the analysis of total phenolic content of the vinegars, 15  $\mu\text{L}$  of each fraction (original concentration: 40 mg/mL with 5% DMSO) were diluted to 0.5 mg/mL. Then 75  $\mu\text{L}$  of Folin–Ciocalteu reagent and 500  $\mu\text{L}$  of water ( $\text{H}_2\text{O}$ ) were added to the reaction mixture. After stirring vortex in all samples 300  $\mu\text{L}$  of 20% aqueous sodium carbonate and 610  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  were added to the mixture and the samples were incubated for 30 min.

After the incubation period 350  $\mu\text{L}$  of each sample were added (0.5 mg/mL) to the wells of a microplate (with quadruplicates of each bottle) and absorbance was read in a microplate reader at 760 nm. To determine the concentration of phenolics present in each fraction a calibration standard curve with a range of concentrations of gallic acid (0.05 to 0.4 mg/mL) was used. The results are shown in total phenolic concentration (mg/mL).

#### **2.4.3. Anthocyanin quantification by HPLC/DAD**

High-performance liquid chromatography (Dionex Ultimate Thermo Scientific® Standard 3000) was performed to analyze anthocyanin content. A reversed- phase C18 column (LiChrospher® 100 RP -18, 5  $\mu\text{m}$ , 25 cm) at 25°C, was used to separate the anthocyanins and eluted with a gradient system consisting of ultra-purified water and formic acid (9:1 v/v) as solvent A and water, formic acid and acetonitrile (6:1:3 v/v/v) as solvent B at a flow rate of 1.0 mL.min<sup>-1</sup> and run time of 52 minutes as described by (Fernandes, Nave, Goncalves, de Freitas, & Mateus, 2012). The identification was achieved by comparing the retention time of pure anthocyanins peaks. Quantitative analyses were carried out with an external calibration curve and expressed as cyanidin-3-glucoside equivalents. All analyses were performed in triplicate. Prior to ingestion the samples were diluted in acidulated methanol: elderberry vinegar 1000x vinegar and the remaining vinegars 10x.

## 2.5. Statistical analyses

The average of duplicate analyses of four independent experiments ( $n=4 \times 2$ ) was calculated for each PAH and  $\Sigma$ PAH<sub>4</sub>. The results were analysed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA), since normal distribution of the residuals was confirmed. Whenever statistical significances were found, Duncan post-hoc test was applied for mean comparison of PAHs levels between the seven groups of meats (control and vinegar treatments). Principal component analysis (PCA) was performed using PAHs levels and vinegar properties (DPPH, FRAP, total phenols and anthocyanin contents) as variables to reduce the dimensionality of the data and pinpoint the most important vinegar effects. Subsequently, nonlinear regression analyses were conducted to study the relationships between PAHs formation (Y-matrix) and vinegar parameters (X- matrix) in terms of prediction of Y-variables from X to variables, nonlinear regression was also used. Calibration and validation coefficients were analysed. ANOVA and PCA analyses were performed at 5% significance level, using IBM SPSS Statistics version 25 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Nonlinear regression analyses were conducted with the XLSTAT for Windows version 2016.02 (Addinsoft, Paris, France) at 5% significance level.

## Results and discussion

### 3.1. Phenolic content and antioxidant activity of vinegars

In our study the total phenolic compound in vinegars varied from 26.67 mg L<sup>-1</sup> (apple cider vinegar) to 7849.72 mg L<sup>-1</sup> (EV). Cruz et. Al. (Cruz, Correia, Gonçalves, & Jordão, 2018) found a variation total phenolic compound from 720.7 to 1052.7 mg L<sup>-1</sup> in red wine vinegars from Portuguese market. In relation to red wine vinegar the value obtained was slightly lower than the described by Cruz et al. (Cruz, et al., 2018) for Portuguese red wine vinegar. This differences can be explain because the vinegars production had an important impact on the phenolic composition promote the variability of phenolic content (Bakir, Toydemir, Boyacioglu, Beekwilder, & Capanoglu, 2016; Ubeda, et al., 2013).

It has been verified that it is the EV presented the highest capacity with  $2238.22 \pm 88.95$   $\mu$ M (DPPH) and  $3180.73 \pm 28.96$   $\mu$ M (FRAP). The antioxidant capacity found was

coincident with the content of phenolic compounds verify on vinegars studied, this is similar to those verified by other authors (Lu, Cao, Yang, Jin, & Luo, 2018).

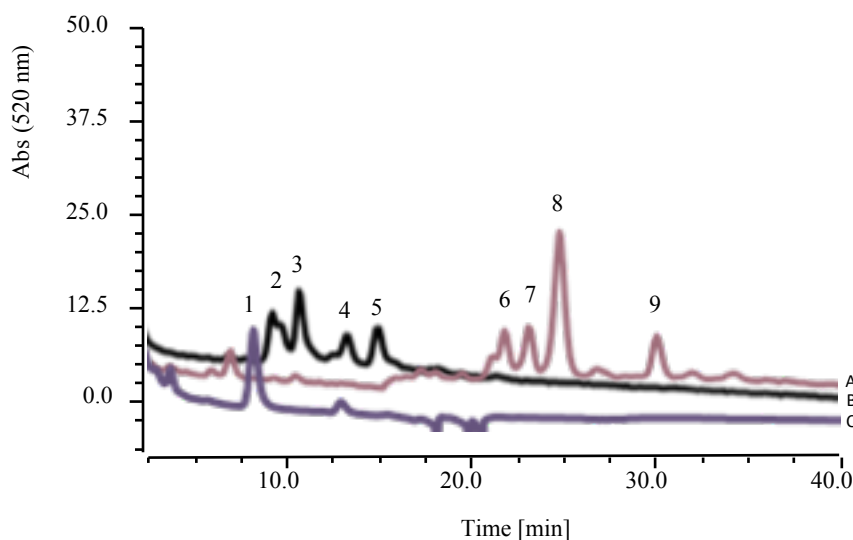
The content of anthocyanins present in the different vinegars was analyzed and, as expected, the vinegar with the highest anthocyanin content was the elderberry vinegar followed by the red wine vinegar and vinegar with raspberry juice. A study analyzing the various contents of phenolic compounds in red wine vinegars on the market found a total amount of anthocyanins ranging from 14.3 to 31.1 mg L<sup>-1</sup> of anthocyanins (Cruz, et al., 2018). In our study, the red wine vinegar had a anthocyanin content of 18.60 mg mL<sup>-1</sup>, however the elderberry vinegar contained 450.0 mg mL<sup>-1</sup> (Fig.1). In fact, wine usually has an anthocyanin content 2-fold higher than some types of red wine (Schmitzer, Veberic, Slatnar, & Stampar, 2010). As well all the phenolic compounds exhibited positive effects on DPPH radical scavenging activity (Table 1)

Table 1 - Radical scavenging activity (DPPH), reducing capacity (FRAP) and phenolic compounds of different types of vinegars

	Antioxidant capacity ( $\mu$ M equivalent trolox)						Phenolic compounds		
	DPPH			FRAP			Total Phenols (GAE mg mL <sup>-1</sup> ) (Anthocyanin mg mL <sup>-1</sup> )		
White wine vinegar	34.80	±	1.31	35.48	±	0.63	106.17	±	8.80
Red wine vinegar	35.74	±	1.77	43.01	±	0.16	369.45 (18.60)	±	18.08
Elderberry vinegar	2238.22	±	88.95	3180.73	±	28.96	7849.72 (450.00)	±	482.35
Apple cider vinegar	19.14	±	1.43	10.75	±	0.42	32.16	±	2.11
Apple cider vinegar with raspberry juice	19.81	±	0.44	10.09	±	0.16	26.67 (10.30)	±	0.92

Legend: DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; FRAP - Ferric reducing antioxidant power

The anthocyanin HPLC profile of the vinegar with anthocyanin content was depicted in Fig. 1. Different anthocyanins were identified depending of red fruits sources.



Legend: 1 - Cyanidin-3,5-diglucoside/Cyanidin-3-sambubiose-5-glucoside; 2 - Cyanidin-3-sophoroside; 3 - Cyanidin-3-(2-glucosylrutinoside); 4 - Cyanidin-3-glucoside/Cyanidin-3-sambubiose; 5 - Pelargonidin-3-sophoroside/Cyanidin-3-rutinoside; 6 - Petunidin-3-glucoside; 7 - Peonidin-3-glucoside; 8 - Malvidin-3-glucoside; 9 - Vitisin A

Figure 1 - HPLC chromatogram and identification of anthocyanins present in red wine vinegar (A), apple cider vinegar with raspberry (B) and elderberry vinegar (C), by LC-MS.

### 3.2. Effect of vinegars on PAHs formation

PAH4 concentrations in charcoal-grilled pork loin are presented in Table 2. In control, samples the four PAHs under study were quantified and their sum was around  $31.5 \pm 4.16$  ng g<sup>-1</sup> of wet weight. Considering the qualitative profile Ch > BaA > BbF > BaP was found. Viegas et al. (Viegas, et al., 2014) also found this profile in similar samples, however, the sum of PAH4 was lower than the values presented in the present work ( $17.3$  ng g<sup>-1</sup> vs  $31.5$  ng g<sup>-1</sup>). In the present study samples were grilled directly on the disposable barbecue (1cm from the heat source) and Viegas et al. (Viegas, et al., 2014) used a garden-type barbecue and samples were cooked at 15 cm from the bed of charcoal, this difference may explain the different results. In general, the amount of PAHs produced increases when the food is cooked closer to the heat source (EFSA, 2008; Lijinsky & Ross, 1967).

Table 2 – PAH4 Formation on charcoal grilled pork Loin after seasoning with different types of vinegar (n=4 x 2)

Vinegar type	Concentration of PAH4 ng g <sup>-1</sup>				ΣPAH4		Inhibitory effect
	BaA	Ch	BbF	BaP	Mean ± sd		
Control	9.06 ± 1.40 <sup>a</sup>	11.92 ± 1.76 <sup>b</sup>	7.09 ± 0.95 <sup>b</sup>	3.40 ± 0.27 <sup>a</sup>	31.47 ± 4.16 <sup>b</sup>		-
Blank vinegar	10.30 ± 2.20 <sup>a</sup>	14.34 ± 2.78 <sup>a</sup>	8.25 ± 1.50 <sup>a</sup>	3.73 ± 1.05 <sup>a</sup>	36.62 ± 6.82 <sup>a</sup>		-
White wine vinegar	1.87 ± 0.51 <sup>c</sup>	2.03 ± 0.56 <sup>d</sup>	2.26 ± 0.14 <sup>d,e</sup>	0.50 ± 0.21 <sup>c</sup>	6.67 ± 1.24 <sup>d,e</sup>		79%
Red wine vinegar	2.91 ± 0.89 <sup>b,c</sup>	4.02 ± 1.37 <sup>c</sup>	2.76 ± 0.54 <sup>c,d</sup>	1.05 ± 0.37 <sup>b,c</sup>	10.74 ± 3.16 <sup>c,d</sup>		66%
Elderberry vinegar	1.51 ± 0.40 <sup>c</sup>	1.90 ± 0.47 <sup>d</sup>	1.42 ± 0.28 <sup>e</sup>	0.77 ± 0.22 <sup>c</sup>	5.60 ± 1.30 <sup>e</sup>		82%
Cider vinegar	2.95 ± 0.57 <sup>b,c</sup>	4.06 ± 0.67 <sup>c</sup>	2.79 ± 0.56 <sup>c,d</sup>	0.90 ± 0.21 <sup>b,c</sup>	10.70 ± 1.81 <sup>c,d</sup>		66%
Apple cider vinegar with raspberry juice	3.96 ± 1.48 <sup>b</sup>	5.01 ± 1.41 <sup>c</sup>	3.81 ± 1.46 <sup>c</sup>	1.41 ± 0.51 <sup>b</sup>	14.19 ± 4.82 <sup>c</sup>		55%

Means with different letters in the same column are significantly different (p < 0.05);

Legend: PAH4 – polycyclic aromatic hydrocarbons according European Commission; BaA – Benzo(a)anthracene; Ch – Chrysene; BbF – Benzo(b)fluoranthene; BaP – Benzo(a)pyrene;

EU established maximum levels of PAH4, 30 ng g<sup>-1</sup> for heat-treated meat, i.e. only grilling and barbecuing (Commission Regulation, 2011). The value found in control samples, 31.47 ng g<sup>-1</sup>, grilled at an edible level (well done), exceeded this maximum.

Concerning BaP level, grilled pork samples presented 3.40 ± 0.27 ng g<sup>-1</sup>. This values was lower than the maximum established, however Chung et al. (Chung, et al., 2011) screened different heat treatments on beef and pork and found the higher value of BaP in charcoal grilled pork samples (3.0 ng g<sup>-1</sup>) an reported as an extremely high level. In Viegas et al. (Viegas, et al., 2014) lower value of PAH4 was described; however, the value of BaP was also around 3.0 ng g<sup>-1</sup>.

As referred by EU (Commission Regulation, 2011) both PAH4 and BaP maximum levels are avoidable if appropriate processing conditions and equipment are used. In our previous studies, PAHs content in grilled meats were highly reduced using antioxidant rich seasonings(Garcia-Lomillo, et al., 2017) and beer marinades (Viegas, et al., 2014). In the present work we intended to determine if fruit derived vinegars which are antioxidant/polyphenol rich can be used as efficient mitigation strategies on PAHs exposition, in order to avoid levels exciding maximum EU regulation.

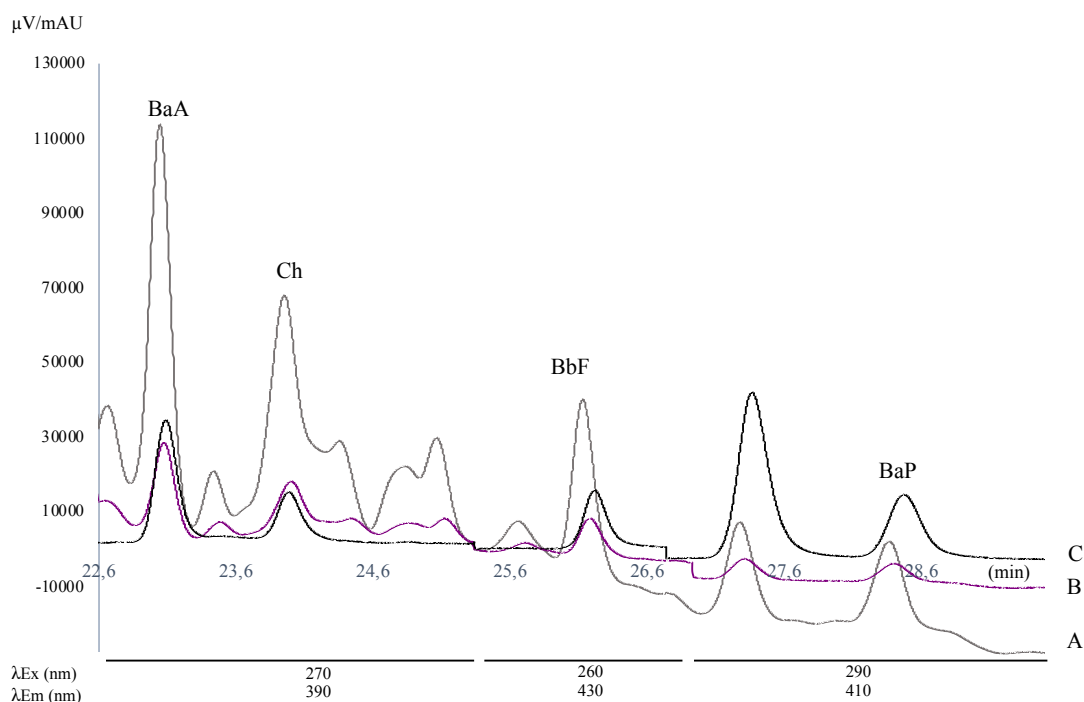
Vinegar is a result of alcoholic fermentation and subsequent acetic fermentation with a residual alcohol content and formation of 5-6 % of acetic acid (European Committee for Standardization, 2008). In order to despite the effect of the acetic acid from vinegars on PAHs formation, a blank vinegar (solution of 5 % of acetic acid) was prepared and spread on pork loin prior grill.

The PAHs formation was higher in blank vinegar treated meat than in control, being PAH4 (36.62 vs 31.47 ng g<sup>-1</sup>), Ch (14.34 vs 11.92 ng g<sup>-1</sup>) and BbF (7.09 vs 8.25 ng g<sup>-1</sup>) significantly higher. Recently, Wongmaneepratip & Vangnai (Wongmaneepratip & Vangnai, 2017) found that acidic pH may help to decrease the formation of PAHs. Our results are different from the observed by Wongmaneepratip & Vangnai (Wongmaneepratip & Vangnai, 2017), however authors used a very low concentration of acid (0.1- 0.2 % of citric acid) when compared with vinegar. On the other hand, acidic marinades (acetic acid, citric acid, lactic acid, etc.) increases tenderness of cooked meat which involves several factors such as weakening of muscle structures, increase of proteolysis and conversion of collagen to gelatin during cooking (Önenç, Serdaroğlu, & Abdraimov, 2004; Sharedeh, Gatellier, Astruc, & Daudin, 2015). Furthermore, acidic treatments decrease the water holding capacity (Önenç, et al., 2004) and increase lipid and protein oxidation (Sharedeh, et al., 2015) of meat. All these microstructural changes may explain the lack of PAHs inhibition observed on blank vinegar treated meat.

In opposite to the effect of blank vinegar on PAHs formation, the vinegars derived from fruits and wines, significantly inhibited the PAHs formation on grilled pork loin. Probably the polyphenols of these vinegars and their antioxidant capacity could reverse the adverse effect elicited to the acidity triggered by the acetic acid (blank vinegar) on PAHs formation in meat. Similarly, Farhadian, et al. (Farhadian, et al., 2012) described that the addition of acidic ingredients, polyphenol rich, namely lemon or tamarind juice to marinade treatments resulted in reduced PAH formation in grilled beef meat.

From all vinegars tested, elderberry vinegar was the most efficient on inhibition of PAH4 (5.60 ± 1.30 ng g<sup>-1</sup>, 82 % less than control). Chromatograms of control and elderberry treated meats were depicted on Fig. 2.





Legend: BaA – Benzo(a)anthracene; Ch – Chrysene; BbF – Benzo(b)fluoranthene; BaP – Benzo(a)pyrene;

Figure 2 - Detail of representative chromatograms from grilled pork loin: control (A), seasoned with elderberry vinegar (B) and blank matrix spiked (C) with PAHs at the  $2 \text{ ng g}^{-1}$  level was also presented for identification.

White wine vinegar also presented a strong inhibition on PAHs formation ( $6.68 \pm 1.23 \text{ ng g}^{-1}$ ,  $\Sigma\text{PAH}_4$ ; 79 % less than control). Red wine and apple cider vinegar treated meats presented similar amounts of PAH<sub>4</sub> (around  $10.7 \text{ ng g}^{-1}$ ; 66% less than control) and individual compounds. The higher inhibitory effect of white wine vinegar compared with red wine vinegar was somewhat unexpected, since total phenols content of red wine vinegar was more than three times higher, however, the antioxidant capacities were similar. A possible explanation was antioxidant additive enable to be used on wine and vinegars production is the sulphur dioxide (FAO, 2000). This non-phenolic compound have been reported to prevent the Maillard reactions and Farhadian et al. (Farhadian, et al., 2012) reported that lemon juice with  $350 \text{ mg/kg}$  of sulphur dioxide compound, may contribute to the reduction of PAHs concentration in beef.

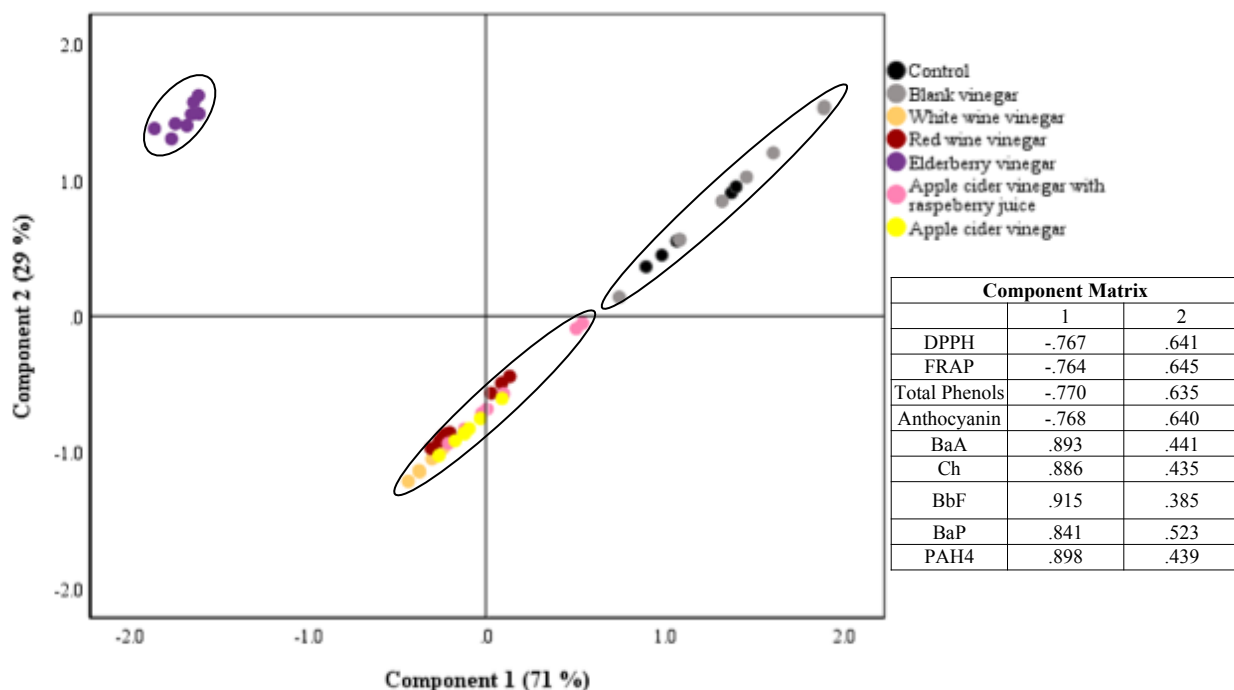
The apple cider with raspberry was the weakest vinegar on PAHs inhibition ( $14.19 \pm 4.82 \text{ ng g}^{-1}$ ), however presented an inhibition of 55 %. The profile of PAH<sub>4</sub> in vinegar treated

meats followed the same profile of control and blank vinegar (Ch>BaA>BbF>BaP), except for white wine vinegar treated meats (BbF>Ch>BaA>BaP).

Studies on the kinetics and mechanism of formation of PAHs indicated that PAHs contribute to the aromatic products of the Maillard reactions (Britt, Buchanan, Owens Jr, & Skeen, 2004); however, due to the complexity of the reactions, its relation to the mechanism of PAHs is not fully understood. It is well accepted that PAHs formation involves free radicals generation; and it is possible that antioxidant compounds can act as an inhibitor of PAHs formation, through the elimination of free radicals precursors (B. H. Chen & Chen, 2001; Sharma, Chan, & Hajaligol, 2006).

The use of tea (Wang et al 2018) and beer (Viegas et al 2014) marinades was described as effective strategies to inhibit PAHs formation on grilled meat. Authors (Viegas, et al., 2014; C. Wang, et al., 2018) pointed that antioxidants naturally present in tea and beer may act as inhibitors of PAHs formation by functioning as radical quenchers and scavengers.

Considering the effect of phenolic compounds (total phenols and anthocyanins) and antioxidant activity (FRAP and DPPH) of the different vinegars and also the effect of those on PAHs formation, together with control and blank vinegar, a principal component analysis (PCA) was performed to reduce the dimensionality of the data (Fig 3). The results of PCA are depicted on a two-dimensional plot, which explain the variance. Component one explains 71% of the variance in the data, and was positively correlated ( $\geq 0.841$ ) with levels of PAHs (direction in which their levels increase), and negatively correlated ( $\leq -0.764$ ) with phenolic compounds and antioxidant activities of treatments.



Legend: BaA – Benzo(a)anthracene; Ch – Chrysene; BbF – Benzo(b)fluoranthene; BaP – Benzo(a)pyrene; DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; FRAP - Ferric reducing antioxidant power; PAH4 – polycyclic aromatic hydrocarbons according European Commission;

Figure 3 – Two-dimensional plot representing the PCA of data from PAHs.

Component two explained 29% of the variance of the data; this dimension is positively related to the all variables under study, however the correlation was weaker.

Three different clusters can be formed from PCA. The cluster A comprises the control and the blank vinegar data, with higher PAHs content and absence of phenolics. The cluster B with data related with fruit and wine vinegars, except the elderberry vinegar (cluster C), which was clearly separated from the other vinegars, probably due to the exceptional amount of total phenols, which includes anthocyanins, and antioxidant activity together with PAHs inhibitory capacity on meat.

Moderated negative correlations were found between  $\sum$ PAH4 and the total phenols (Pearson correlation = - 0.408,  $p \leq 0.01$ ), anthocyanin (Pearson correlation = - 0.403,  $p \leq 0.01$ ), FRAP (Pearson correlation = - 0.398,  $p \leq 0.01$ ) and DPPH (Pearson correlation = - 0.402,  $p \leq 0.01$ ). BaA, Ch and BbF presented similar correlation and significant levels of  $\sum$ PAH4. BaP, was also negatively correlated with these vinegar parameters, however the correlation was weaker (Pearson correlation = - 0.30,  $p \leq 0.05$ ).

Viegas et al (2014) observed, although not statistically significant, a positive correlation between the higher radical-scavenging activity of beer marinades and a decrease of PAH

formation (Pearson correlation = 0.606,  $p = 0.202$ ). With vinegars, weakest correlations were observed, but significance was achieved.

Recently Wang et al (Chong Wang, et al., 2019) confirmed using eight pure phenolic compounds that these compounds are effective on inhibition of PAHs formation. However, authors reported an unexpected poor correlation between scavenging activities and inhibitory effects of phenolic antioxidants. Weaker phenolic antioxidants in scavenging activity in the DPPH assay showed excellent inhibition of PAHs formation in charcoal grilled chicken wings. These findings were in agreement with our results in respect of elderberry vinegar with DPPH of 2238.22  $\mu\text{M}$  equivalent trolox vs white wine vinegar with 34.80  $\mu\text{M}$  equivalent trolox, with 82 % and 79 % of PAH4 inhibition. The same was observed if compared with FRAP and total phenols results for these vinegars.

### 3.3. Regression modeling for PAHs formation

In order to clarify the effect of total phenols and antioxidant capacity on PAHs formation data was analyzed using regression models. Equations ( $f(x)$ ) with best fitting performance (higher  $R^2$  and lower RMSE) were selected (Table 3). Although modeling could be carried out in individual vinegars, the goal was to try to find a pattern of phenolic (total phenols) and antioxidants (FRAP). If vinegars were considered individually, 1st degree polynomial equations (Supplementary Table 4) were enough to explain the relationship between variables and PAHs formation. The best fitting performance when results of all treatments were considered, was achieved at 3rd degree polynomial equations for  $\Sigma\text{PAH}_4$ , and also for each PAH under study. This polynomial equations degree reflects the differences inherent to each vinegar not justified by only phenols and/or antioxidants. Although interpretation is not as evident as with regarding the 1st degree equations obtained for vinegars individually, the 3rd degree polynomial equations provides valuable insights on the complexity of the mechanism of inhibition of PAHs that seems to be more complex than only radical scavenging by antioxidants.

Table 3 - Regression models and equations (f(x)) with best fitting performance of vinegars

Dependent Variable (Y)	Explanatory variables (X)	Regression model	Equation for the model	R <sup>2</sup>	RMSE
<b>BaA</b>	Total Phenols (P) Antioxidante Capacity (A)	3rd degree polynomial	$BaA = 8.49 - 0.31A + 1.85 \times 10^{-02}P + 1.72 \times 10^{-04}A^2 + 3.70 \times 10^{-06}P^2 - 2.87 \times 10^{-08}A^3 - 4.016 \times 10^{-10}P^3$	0.753	2.000
<b>Ch</b>	Total Phenols (P) Antioxidante Capacity (A)	3rd degree polynomial	$Ch = 11.55 - 0.47A + 3.10 \times 10^{-02}P + 2.57 \times 10^{-04}A^2 + 4.02 \times 10^{-06}P^2 - 4.24 \times 10^{-08}A^3 - 4.92 \times 10^{-10}P^3$	0.751	2.800
<b>BbF</b>	Total Phenols (P) Antioxidante Capacity (A)	3rd degree polynomial	$BbF = 6.93 - 0.21A + 1.08 \times 10^{-02}P + 1.12 \times 10^{-04}A^2 + 4.40 \times 10^{-06}P^2 - 1.92 \times 10^{-08}A^3 - 4.23 \times 10^{-10}P^3$	0.742	1.537
<b>BaP</b>	Total Phenols (P) Antioxidante Capacity (A)	3rd degree polynomial	$BaP = 3.79 - 0.34A + 3.48 \times 10^{-03}P + 7.01 \times 10^{-03}A^2 - 5.28 \times 10^{-05}P^2 - 3.25 \times 10^{-06}A^3 + 9.74 \times 10^{-08}P^3$	0.893	0.510
<b>ΣPAH4</b>	Total Phenols (P) Antioxidante Capacity (A)	3rd degree polynomial	$\Sigma PAH4 = 30.16 - 1.13A + 0.068P + 6.08 \times 10^{-04}A^2 + 1.571 \times 10^{-05}P^2 - 1.02 \times 10^{-07}A^3 - 1.65 \times 10^{-09}P^3$	0.758	6.941

Legend: PAH4 – polycyclic aromatic hydrocarbons according of European Comission; BaA – Benzo(a)anthracene; Ch – Chrysene; BbF – Benzo(b)fluoranthene; BaP – Benzo(a)pyrene

## Conclusion

All vinegars enabled the reduction of formation of PAH during processing and household cooking of pork loin. The use of blank vinegar was tested and verify that in culinary can be detrimental because increased the levels of PAHs to values higher than those established by the European Commission. Therefore, the use of seasoning with vinegar made from fruits, naturally rich in phenolic compounds, should be encouraged to reduce the formation of PAHs in charcoal grilled meat and in this way limit the exposure to these carcinogenic compounds. Seasoning meat with wine or fruit vinegar it was suggested their great potential for practical application in daily cooking.

## References

- Arnous, A., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2001). Effect of Principal Polyphenolic Components in Relation to Antioxidant Characteristics of Aged Red Wines. *J Agric Food Chem*, 49(12), 5736-5742.
- Bakir, S., Toydemir, G., Boyacioglu, D., Beekwilder, J., & Capanoglu, E. (2016). Fruit Antioxidants during Vinegar Processing: Changes in Content and in Vitro Bio-Accessibility. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1658.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.Free Radical Method. *LWT - Food Science and Technology*, 30(6), 609-615.
- Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K. Z., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Mattock, H., & Straif, K. (2015). Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *The Lancet Oncology*, 16(16), 1599-1600.
- Britt, P. F., Buchanan, A., Owens Jr, C. V., & Skeen, J. T. (2004). Does glucose enhance the formation of nitrogen containing polycyclic aromatic compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons in the pyrolysis of proline? *Fuel*, 83(11-12), 1417-1432.
- Chen, B. H., & Chen, Y. C. (2001). Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Smoke from Heated Model Lipids and Food Lipids. *J Agric Food Chem*, 49(11), 5238-5243.
- Chen, H., Chen, T., Giudici, P., & Chen, F. (2016). Vinegar Functions on Health: Constituents, Sources, and Formation Mechanisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 1124-1138.
- Chung, S. Y., Yettella, R. R., Kim, J. S., Kwon, K., Kim, M. C., & Min, D. B. (2011). Effects of grilling and roasting on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in beef and pork. *Food Chemistry*, 129(4), 1420-1426.
- Commission Regulation. (2011). Commission Regulation (EU) No 835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs Text with EEA relevance. In.

Cruz, M., Correia, A. C., Gonçalves, F. J., & Jordão, A. M. (2018). Phenolic composition and total antioxidant capacity analysis of red wine vinegars commercialized in Portuguese market. *Ciencia e Tecnica Vitivinicola*, 33(2), 102-115.

EFSA. (2008). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA Journal*, 6(8), 724.

European Commission. (2011). Commission Regulation (EU) No 835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. In O. J. o. t. E. Union (Ed.), (Vol. 215, pp. 1-5).

European Committee for Standardization. (2008). NP EN 13188:2008-pt Vinegar; Product made from liquids of agricultural origin; Definitions, requirements, marking. In. Brussel: Instituto Português da Qualidade.

FAO. (2000). Proposed draft revised regional standard for vinegar. Codex Alimentarius Commission, Joint FAO. In WHO Food Standards Programme.

Farhadian, A., Jinap, S., Faridah, A., & Zaidul, I. S. M. (2012). Effects of marinating on the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons (benzo[a]pyrene, benzo[b]fluoranthene and fluoranthene) in grilled beef meat. *Food Control*, 28(2), 420-425.

Farhadian, A., Jinap, S., Hanifah, H. N., & Zaidul, I. S. (2011). Effects of meat preheating and wrapping on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in charcoal-grilled meat. *Food Chemistry*, 124(1), 141-146.

Fernandes, I., Nave, F., Goncalves, R., de Freitas, V., & Mateus, N. (2012). On the bioavailability of flavanols and anthocyanins: flavanol-anthocyanin dimers. *Food Chem*, 135(2), 812-818.

Garcia-Lomillo, J., Viegas, O., Gonzalez-SanJose, M. L., & Ferreira, I. M. (2017). Influence of red wine pomace seasoning and high-oxygen atmosphere storage on carcinogens formation in barbecued beef patties. *Meat Sci*, 125, 10-15.

Janoszka, B. (2011). HPLC-fluorescence analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in pork meat and its gravy fried without additives and in the presence of onion and garlic. *Food Chemistry*, 126(3), 1344-1353.

Laranjo, M., Potes, M. E., Gomes, A., Véstia, J., Garcia, R., Fernandes, M. J., Fraqueza, M. J., & Elias, M. (2019). Shelf-life extension and quality improvement of a Portuguese

traditional ready-to-eat meat product with vinegar. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(1), 132-140.

Lijinsky, W., & Ross, A. E. (1967). Production of carcinogenic polynuclear hydrocarbons in the cooking of food. *Food and Cosmetics Toxicology*, 5(C), 343-347.

Lu, S., Cao, Y., Yang, Y., Jin, Z., & Luo, X. (2018). Effect of fermentation modes on nutritional and volatile compounds of Huyou vinegar. *Journal of Food Science and Technology*, 55(7), 2631-2640.

Mikulic-Petkovsek, M., Schmitzer, V., Slatnar, A., Todorovic, B., Veberic, R., Stampar, F., & Ivancic, A. (2014). Investigation of anthocyanin profile of four elderberry species and interspecific hybrids. *J Agric Food Chem*, 62(24), 5573-5580.

Önenç, A., Serdaroğlu, M., & Abdraimov, K. (2004). Effect of various additives to marinating baths on some properties of cattle meat. *European Food Research and Technology*, 218(2), 114-117.

Patel, N., & Welham, S. J. M. (2013). Peptic digestion of beef myofibrils is modified by prior marination. *Food & Nutrition Research*, 57, 5.

Rose, M., Holland, J., Dowding, A., Petch, S. R., White, S., Fernandes, A., & Mortimer, D. (2015). Investigation into the formation of PAHs in foods prepared in the home to determine the effects of frying, grilling, barbecuing, toasting and roasting. *Food Chem Toxicol*, 78, 1-9.

Schmitzer, V., Veberic, R., Slatnar, A., & Stampar, F. (2010). Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Wine: A Product Rich in Health Promoting Compounds. *J Agric Food Chem*, 58(18), 10143-10146.

Seabra, I. J., Braga, M. E. M., Batista, M. T. P., & de Sousa, H. C. (2010). Fractioned High Pressure Extraction of Anthocyanins from Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Pomace. *Food and Bioprocess Technology*, 3(5), 674-683.

Sharedeh, D., Gatellier, P., Astruc, T., & Daudin, J.-D. (2015). Effects of pH and NaCl levels in a beef marinade on physicochemical states of lipids and proteins and on tissue microstructure. *Meat Sci*, 110, 24-31.

Sharma, R. K., Chan, W. G., & Hajaligol, M. R. (2006). Product compositions from pyrolysis of some aliphatic  $\alpha$ -amino acids. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 75(2), 69-81.



- Silva, M., Viegas, O., Melo, A., Finteiro, D., Pinho, O., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2018). Fast and Reliable Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Grilled and Smoked Muscle Foods. *Food Analytical Methods*, 11(12), 3495-3504.
- Sobral, M. M. C., Cunha, S. C., Faria, M. A., & Ferreira, I. M. (2018). Domestic Cooking of Muscle Foods: Impact on Composition of Nutrients and Contaminants. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(2), 309-333.
- Ubeda, C., Callejón, R. M., Hidalgo, C., Torija, M. J., Troncoso, A. M., & Morales, M. L. (2013). Employment of different processes for the production of strawberry vinegars: Effects on antioxidant activity, total phenols and monomeric anthocyanins. *LWT - Food Science and Technology*, 52(2), 139-145.
- Viegas, O., Novo, P., Pinto, E., Pinho, O., & Ferreira, I. M. (2012). Effect of charcoal types and grilling conditions on formation of heterocyclic aromatic amines (HAs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in grilled muscle foods. *Food Chem Toxicol*, 50(6), 2128-2134.
- Viegas, O., Yebra-Pimentel, I., Martinez-Carballo, E., Simal-Gandara, J., & Ferreira, I. M. (2014). Effect of beer marinades on formation of polycyclic aromatic hydrocarbons in charcoal-grilled pork. *J Agric Food Chem*, 62(12), 2638-2643.
- Wang, C., Xie, Y., Wang, H., Bai, Y., Dai, C., Li, C., Xu, X., & Zhou, G. (2019). The influence of natural antioxidants on polycyclic aromatic hydrocarbon formation in charcoal-grilled chicken wings. *Food Control*, 98, 34-41.
- Wang, C., Xie, Y. T., Qi, J., Yu, Y., Bai, Y., Dai, C., Li, C. B., Xu, X. L., & Zhou, G. H. (2018). Effect of Tea Marinades on the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons in charcoal-grilled chicken wings. *Food Control*, 93, 325-333.
- Wongmaneepratip, W., & Vangnai, K. (2017). Effects of oil types and pH on carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in grilled chicken. *Food Control*, 79, 119-125.
- Żochowska-Kujawska, J., Kotowicz, M., Lachowicz, K., & Sobczak, M. (2017). Influence of marinades on shear force, structure and sensory properties of home-style jerky. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment*, 16(4), 413-420.

### Supplementary table

Table 5. Regression models and equations (f(x)) with best fitting performance by individual vinegars (A-E)

A	Dependent Variable (Y)	Explanatory variables (X)	Regression model	Equation for the model	R <sup>2</sup>	RMSE
White Wine Vinegar	BaA	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	BaA = 9.62 - 0.18A - 0.013P	0.751	2.068
		Antioxidante Capacity (A)				
	Ch	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	Ch = 13.08 - 0.48A + 5.56 x 10 <sup>-02</sup> P	0.773	2.759
		Antioxidante Capacity (A)				
	BbF	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	BbF = 7.52 - 0.16A + 3.22 x 10 <sup>-03</sup> P	0.747	1.399
		Antioxidante Capacity (A)				
	BaP	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	BaP = 3.71 - 0.17A + 2.71 x 10 <sup>-02</sup> P	0.833	0.784
		Antioxidante Capacity (A)				
	ΣPAH4	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	ΣPAH4 = 33.58 - 0.98A + 7.27 x 10 <sup>-02</sup> P	0.774	6.712
		Antioxidante Capacity (A)				
Elderberry Vinegar	BaA	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	BaA = 9.30 - 2.21 x 10 <sup>-03</sup> A - 1.03 x 10 <sup>-04</sup> P	0.885	1.552
		Antioxidante Capacity (A)				
	Ch	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	Ch = 12.96 - 3.15 x 10 <sup>-03</sup> A - 1.40 x 10 <sup>-04</sup> P	0.907	1.959
		Antioxidante Capacity (A)				
	BbF	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	BbF = 7.59 - 1.95 x 10 <sup>-03</sup> A + 3.29 x 10 <sup>-06</sup> P	0.893	1.174
		Antioxidante Capacity (A)				
	BaP	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	BaP = 3.44 - 9.39 x 10 <sup>-04</sup> A + 3.98 x 10 <sup>-05</sup> P	0.777	0.788
		Antioxidante Capacity (A)				
	ΣPAH4	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	ΣPAH4 = 33.23 - 8.25 x 10 <sup>-03</sup> A - 2.00 x 10 <sup>-04</sup> P	0.899	5.120
		Antioxidante Capacity (A)				
Red Wine Vinegar	BaA	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	BaA = 9.46 - 0.18A + 2.60 x 10 <sup>-03</sup> P	0.831	1.652
		Antioxidante Capacity (A)				
	Ch	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	Ch = 12.80 - 0.19A - 2.73 x 10 <sup>-03</sup> P	0.850	2.079
		Antioxidante Capacity (A)				
	BbF	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	BbF = 7.85 - 0.11A - 5.56 x 10 <sup>-04</sup> P	0.866	1.108
		Antioxidante Capacity (A)				
	BaP	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	BaP = 3.48 - 5.62 x 10 <sup>-02</sup> A - 1.51 x 10 <sup>-04</sup> P	0.729	0.830
		Antioxidante Capacity (A)				
	ΣPAH4	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	ΣPAH4 = 33.59 - 0.53A - 9.98 x 10 <sup>-04</sup> P	0.857	5.237
		Antioxidante Capacity (A)				
Apple Cider Vinegar	BaA	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	BaA = 9.72 - 0.84A + 7.19 x 10 <sup>-02</sup> P	0.861	1.518
		Antioxidante Capacity (A)				
	Ch	Total Phenols (P)		Ch = 13.47 - 1.53A + 0.22P	0.839	2.305

		Antioxidante Capacity (A)	1st degree polynomial			
	<b>BbF</b>	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	$BbF = 7.60 - 0.57A + 0.04P$	0.841	1.163
		Antioxidante Capacity (A)				
	<b>BaP</b>	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	$BaP = 3.55 - 0.41A + 5.49 \times 10^{-02}P$	0.832	0.664
		Antioxidante Capacity (A)				
	$\Sigma PAH4$	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	$\Sigma PAH4 = 34.34 - 3.35A + 0.38P$	0.869	5.121
		Antioxidante Capacity (A)				
<b>Apple Cider Vinegar with Raspberry juice</b>	<b>BaA</b>	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	$BaA = 9.43 - 0.50A - 2.96 \times 10^{-02}P$	0.788	1.684
		Antioxidante Capacity (A)				
	<b>Ch</b>	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	$Ch = 13.34 - 0.66A - 0.072P$	0.785	2.517
		Antioxidante Capacity (A)				
	<b>BbF</b>	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	$BbF = 7.41 - 0.10A - 0.11P$	0.781	1.170
		Antioxidante Capacity (A)				
	<b>BaP</b>	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	$BaP = 3.46 - 0.15A - 2.34 \times 10^{-02}P$	0.882	0.443
		Antioxidante Capacity (A)				
	$\Sigma PAH4$	Total Phenols (P)	1st degree polynomial	$\Sigma PAH4 = 33.63 - 1.41A - 0.23P$	0.814	5.485
		Antioxidante Capacity (A)				



## **CAPÍTULO VI – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**



O receituário tradicional português é reconhecido pela variedade de métodos de confeção e pela sua riqueza em ingredientes provenientes, essencialmente, da terra. As compotas de frutos e as sobremesas fazem parte integrante deste receituário, contudo, apesar da introdução de fruta ser pouco relevante, certo é que cada vez mais frequente, e recomendado, a sua introdução, para por exemplo diminuir o teor de açúcar. Por outro lado, assistimos ao aumento da produção de pequenos frutos, com especial enfoque nas framboesas e nos mirtilos, bem como o aumento de produção de outros pequenos frutos, que apesar de menos conhecidos, como as bagas de sabugueiro, poderão representar um potencial relevante de utilização por parte do consumidor. Este aumento de produção poderá ser reflexo da importância que o consumidor cada vez mais atribui a estes produtos. Assim, atualmente, encontramos diversas receitas que integram estes produtos nas mais variadas formas, quer em sobremesas quer em pratos salgados.

Na realidade, e conforme já descrito nesta dissertação, é conhecido que estes alimentos contêm compostos, como as antocianinas, que têm diversos benefícios para a saúde, como por exemplo, na prevenção das doenças cardiovasculares e das doenças neurodegenerativas, pelo que o seu consumo deverá ser incentivado, assim como a sua produção nacional. Por outro lado, parece que os processos de confeção poderão afetar negativamente o teor de antocianinas, contudo, a matriz alimentar, o tempo, a temperatura e o método culinário poderão influenciar este efeito.

Foi no estudo do impacto destes fatores que este trabalho se debruçou, ou seja, pretendeu-se compreender de que forma os processos de confeção tradicionais e o tipo de matriz alimentar afetam o teor de antocianinas quando frutos vermelhos são incorporados em receitas tradicionais.

Assim, foi possível verificar que os processos de confeção tradicionais *per si* não afetam significativamente o teor de antocianinas, por exemplo cozer framboesa ou assar framboesa. No entanto, quando incorporados em receitas, como bolos e compotas verificámos que o impacto destes processos é elevado, devido a possíveis interações que poderão ocorrer entre alguns ingredientes como o açúcar (compota) e o bicarbonato de sódio (bolo) em associação com a temperatura de confeção e a estabilidade das antocianinas, verificando-se por esta razão uma diminuição do seu teor face ao controlo. Desta forma, poderá ser recomendado que para melhor aproveitar os benefícios evidentes das antocianinas deverão estes pequenos frutos serem consumidos em cru, confecionados

sem adição de outros ingredientes, ou em sobremesas que não sejam sujeitas a temperatura, como foi o caso da mousse de framboesa.

Este foi um importante contributo uma vez que os estudos que analisam pequenos frutos e os efeitos dos processos de confeção no teor de antocianinas é escasso. Por outro lado, o aumento verificado na utilização destes pequenos frutos e, conseqüentemente, a sua incorporação em receitas, poderá comprometer o efeito antioxidante das antocianinas.

Numa segunda etapa, em face do impacto negativo do teor de antocianinas verificado pela incorporação destes alimentos em receitas tradicionais e considerando a tradição culinária portuguesa, foi desenvolvido um vinagre proveniente de uma fonte natural de antocianinas, a baga de sabugueiro, com o objetivo de compreender se a sua utilização poderá trazer benefícios. Assim, primeiramente foi realizado um estudo exploratório sobre o impacto que o processo de produção industrial pode ter no teor de antocianinas, comparando esse impacto nas várias fases do processo de fabrico, ou seja, a fermentação alcoólica e a fermentação acética. Foi possível verificar que o impacto do processo industrial de fabrico do vinagre de sabugueiro provocou uma ligeira diminuição do teor de antocianinas, nomeadamente no final do processo de fermentação acética, ou seja, no produto final face ao teor presente no alimento. Já com a fermentação alcoólica verificou-se que promovia um aumento deste teor, possivelmente devido à rutura das paredes celulares provocada pela ação das leveduras e pela temperatura, fazendo com que estes compostos se tornassem mais disponíveis, processo já anteriormente descrito em outros alimentos por outros autores.

Após o conhecimento do efeito que o processo industrial de fabrico de vinagre teve no teor de antocianinas, considerou-se relevante conhecer o impacto do tempero de vários tipos de vinagres na formação de PAHs em carne de porco grelhado em carvão, uma vez que havia sido verificado por outros autores uma redução de formação de PAHs utilizando marinadas de vinho, chá e cerveja.

Como é conhecido em Portugal, é frequente a utilização de temperos de vinagre para melhorar o sabor e a tenrura da carne, sendo também tradicional grelhar carne com recurso a carvão. Utilizando os conhecimentos tradicionais de utilização de tempero de vinagre foi demonstrado por este trabalho que após a sua aplicação ocorre uma redução elevada na formação de PAHs. Podemos com este trabalho demonstrar que o benefício da utilização empírica de vinagre para o tempero da carne irá além do que é a incorporação de sabor e aumenta a maciez e tenrura da carne.



O trabalho descrito nesta dissertação mostrou ainda que dos vinagres tradicionais testados, capazes de diminuir a formação de PAHs durante o processo culinário, o vinagre de sabugueiro apresentou um efeito mais expressivo. Pode assim concluir-se que o elevado teor de antocianinas poderá ser potenciador deste efeito de mitigação. No entanto, também o vinagre de vinho branco, de cidra e de vinho tinto promoveram uma ação similar ao do vinagre de sabugueiro, o que nos leva a inferir que existem outros compostos na constituição dos vinagres que também induzem a mitigação de PAHs. Por outro lado, a adição de sumo de frutos vermelhos a um vinagre de fruta não apresentou uma redução tão elevada, pelo que do ponto de vista de utilização para a mitigação da formação de PAHs, estes produtos parecem não trazer uma vantagem tão significativa como os seus similares vinagres feitos de raiz com este fruto.

As limitações deste trabalho são inerentes à dificuldade de simulação exata da replicação da culinária tradicional para posterior análise. Tal poderá atribuir-se a vários fatores que interferem no processo de confeção, e que neste estudo foram controlados, podendo conduzir a alterações dos resultados face ao que por norma o consumidor poderá realizar habitualmente.

Assim, dos estudos apresentados podemos concluir que:

- A matriz da receita e o tipo de método de confeção podem afetar a estabilidade e acessibilidade das antocianinas em frutos frescos;
- A incorporação pequenos frutos em receitas que não são confeccionadas, como a mousse, poderá ser a uma estratégia para preservar o teor de antocianinas;
- As bagas de sabugueiro podem ser uma boa escolha para a produção de um novo vinagre, tempero ácido, e que este poderá ser uma fonte de excelência em antocianinas e que poderá ser usado na preparação culinária.

A utilização dos vinagres como tempero de carne possibilita a redução da formação de PAHs em carne de porco grelhada em carvão, de modo que a utilização de tempero com um vinagre rico em compostos fenólicos, especialmente antocianinas, deve ser incentivado para reduzir a exposição a esses compostos com potencial carcinogénico.

Por fim, esta dissertação apresenta com assunto relevante nas Ciências do Consumo Alimentar e Nutrição e das Ciências da Nutrição, uma vez que foram levantadas questões

pertinentes, para as quais foram desenhados protocolos experimentais com metodologias adequadas, e cujos resultados obtidos e descritos têm impacto em diversas áreas como são exemplo a Nutrição Humana, a Alimentação Humana, a Química dos Alimentos e a Gastrotecnia.

### **Perspetivas futuras**

Os dados desenvolvidos por este trabalho permitiram compreender o impacto que os processos tradicionais de culinária portuguesa têm nas antocianinas presentes nos frutos vermelhos. Estes são dados com aplicação prática em estudos epidemiológicos, pois conhecendo o impacto dos processos culinários no teor de antocianinas, as avaliações de frequência alimentar devem considerar estes factos. Assim, com base nestes resultados, poder-se-á incentivar o consumo regular destes alimentos, com conhecimento mais completo das possíveis formas do seu consumo.

Seria relevante, conhecer os hábitos de consumo destes pequenos frutos, compreendendo as razões que levam o consumidor a escolher estes frutos, qual a sua frequência e forma de consumo, bem como as técnicas culinárias utilizadas. Deste modo, teríamos um melhor conhecimento sobre os hábitos de consumo deste pequenos frutos, e inerentemente do consumo de antocianinas.

Por outro lado, seria importante avaliar e analisar o impacto do processo de fabrico de um vinagre constituído por outros frutos vermelhos para que se possa verificar o mesmo comportamento industrial que o obtido a partir da baga de sabugueiro.

Este estudo analisou o impacto do tempero da carne com vinagres, bem como o seu impacto na formação de PAHs. Nesse sentido, seria agora relevante estudar se a incorporação deste vinagre noutros temperos, como por exemplo, em massa de pimentão, massa de alho, entre outros, poderá ter um efeito similar à sua aplicação isoladamente.

Seria ainda pertinente compreender se temperar alimentos com vinagres também terá ação de mitigação na formação de outros carcinogénicos como as aminas heterocíclicas e a acrilamida.

De grande relevância ainda será estudar qual a biodisponibilidade que as antocianinas têm após a ingestão de alimentos enriquecidos com estes frutos e se a ingestão deste vinagre em cru poderá ser uma forma de proteger o organismo da ação carcinogénica que os PAHs poderão ter.

Por fim, e conhecendo o impacto negativo que o sal tem na saúde da população, seria ainda importante estudar, através de estudos de análise sensorial, se o tempero com este vinagre poderá ter impacto positivo na redução de adição de sal na alimentação.



## **CAPÍTULO VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



1. Goodarzi S, Rafiei S, Javadi M, Haghghighian HK, Noroozi S. A Review on Antioxidants and Their Health Effects. *Journal of Nutrition and Food Security*. 2018;3(2):106-12.
2. French RB, Olcott HS, Mattill HA. Antioxidants and the Autoxidation of Fats. III. *Industrial & Engineering Chemistry*. 1935;27(6):724-8.
3. Mills R, Wu GZ. Synthesis and Evaluation of Novel Prodrugs of Foscarnet and Dideoxycytidine with a Universal Carrier Compound Comprising a Chemiluminescent and a Photochromic Conjugate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004;93(5):1320-36.
4. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39(1):44-84.
5. Yehye WA, Rahman NA, Ariffin A, Abd Hamid SB, Alhadi AA, Kadir FA, et al. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;101:295-312.
6. Maltepe E, Saugstad OD. Oxygen in Health and Disease: Regulation of Oxygen Homeostasis-Clinical Implications. *Pediatric Research*. 2009;65:261.
7. Bagchi K, Puri S. Free radicals and antioxidants in health and disease: a review. 1998.
8. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*. 2008;4(2):89.
9. Williams RJP. The necessary and the desirable production of radicals in biology. *Phil Trans R Soc Lond B*. 1985;311(1152):593-603.
10. Clancy S. DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. *Nature Education*. 2008;1(1):103.
11. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(1):29-38.
12. Khanji MY, van Waardhuizen CN, Bicalho VVS, Ferket BS, Hunink MGM, Petersen SE. Lifestyle advice and interventions for cardiovascular risk reduction: A systematic review of guidelines. *International journal of cardiology*. 2018;263:142-51.
13. Bradbury KE, Appleby PN, Key TJ. Fruit, vegetable, and fiber intake in relation to cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *The American journal of clinical nutrition*. 2014;100 Suppl 1:394s-8s.
14. Mahoney SE, Loprinzi PD. Influence of flavonoid-rich fruit and vegetable intake on diabetic retinopathy and diabetes-related biomarkers. *Journal of diabetes and its complications*. 2014;28(6):767-71.
15. Hosseini B, Berthon BS, Saedisomeolia A, Starkey MR, Collison A, Wark PAB, et al. Effects of fruit and vegetable consumption on inflammatory biomarkers and immune cell populations: a systematic literature review and meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*. 2018.
16. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*. 1998;56(11):317-33.
17. Brewer M. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2011;10(4):221-47.
18. Minisci F. *Free radicals in biology and environment*: Springer Science & Business Media; 2013.
19. Gry J, Black L, Eriksen FD, Pilegaard K, Plumb J, Rhodes M, et al. EuroFIR-BASIS—a combined composition and biological activity database for bioactive compounds in plant-based foods. *Trends in food science & technology*. 2007;18(8):434-44.
20. Mottaghi T, Amirabdollahian F, Haghghighatdoost F. Fruit and vegetable intake and cognitive impairment: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *European journal of clinical nutrition*. 2017.
21. Cassidy A. Berry anthocyanin intake and cardiovascular health. *Molecular aspects of medicine*. 2018;61:76-82.

22. Villalba JJ, Costes-Thire M, Ginane C. Phytochemicals in animal health: diet selection and trade-offs between costs and benefits. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2017;76(2):113-21.
23. Lampe JW. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies-. *The American journal of clinical nutrition*. 1999;70(3):475s-90s.
24. Liu RH. Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *The Journal of Nutrition*. 2004;134(12):3479S-85S.
25. Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr*. 2005;81(1):223S-9S.
26. Miglio C, Chiavaro E, Visconti A, Fogliano V, Pellegrini N. Effects of different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56(1):139-47.
27. Napolitano A, Cascone A, Graziani G, Ferracane R, Scalfi L, Di Vaio C, et al. Influence of variety and storage on the polyphenol composition of apple flesh. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004;52(21):6526-31.
28. Márcio C, Isabel CFRF. The Role of Phenolic Compounds in the Fight against Cancer – A Review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2013;13(8):1236-58.
29. Dicko MH, Gruppen H, Barro C, Traore AS, van Berkel WJ, Voragen AG. Impact of phenolic compounds and related enzymes in sorghum varieties for resistance and susceptibility to biotic and abiotic stresses. *Journal of chemical ecology*. 2005;31(11):2671-88.
30. Fredes C. Antioxidants in Chilean native berries. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2009;8(6):469-78.
31. Gorinstein S, Haruenkit R, Poovarodom S, Vearasilp S, Ruamsuke P, Namiesnik J, et al. Some analytical assays for the determination of bioactivity of exotic fruits. *Phytochemical Analysis*. 2010;21(4):355-62.
32. Wach A, Pyrzynska K, Biesaga M. Quercetin content in some food and herbal samples. *Food Chemistry*. 2007;100(2):699-704.
33. Lima GPP, Vianello F, Corrêa CR, Campos RAdS, Borguini MG. Polyphenols in fruits and vegetables and its effect on human health. *Food and Nutrition sciences*. 2014:1065-82.
34. Adefegha SA, Oboh G. Phytochemistry and mode of action of some tropical spices in the management of type-2 diabetes and hypertension. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013;7(7):332-46.
35. Oboh G, Agunloye OM, Adefegha SA, Akinyemi AJ, Ademiluyi AO. Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (in vitro): a comparative study. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*. 2015;26(2):165-70.
36. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*. 2011;50(3):586-621.
37. Storniole CE, Quifer-Rada P, Lamuela-Raventos RM, Moreno JJ. Piceid presents antiproliferative effects in intestinal epithelial Caco-2 cells, effects unrelated to resveratrol release. *Food & function*. 2014;5(9):2137-44.
38. Burton-Freeman B, Sandhu A, Edirisinghe I. Chapter 35 - Anthocyanins. In: Gupta RC, editor. *Nutraceuticals*. Boston: Academic Press; 2016. p. 489-500.
39. Clifford MN. Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000;80(7):1063-72.
40. Jimenez-Garcia SN, Guevara-Gonzalez RG, Miranda-Lopez R, Feregrino-Perez AA, Torres-Pacheco I, Vazquez-Cruz MA. Functional properties and quality characteristics of bioactive compounds in berries: Biochemistry, biotechnology, and genomics. *Food Research International*. 2013;54(1):1195-207.
41. Francis FJ, Markakis PC. Food colorants: Anthocyanins. *Critical reviews in food science and nutrition*. 1989;28(4):273-314.



42. Laleh GH, Frydoonfar H, Heidary R, Jameei R, Zare S. The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four Berberis species. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2006;5(1):90-2.
43. TURTURICĂ M, OANCEA A, Râpeanu G, Bahrim G. Anthocyanins: naturally occurring fruit pigments with functional properties. *Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI--Food Technology*. 2015;39(1).
44. Castaneda-Ovando A, de Lourdes Pacheco-Hernández M, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food chemistry*. 2009;113(4):859-71.
45. Bąkowska-Barczak A. ACYLATED ANTHOCYANINS AS STABLE, NATURAL FOOD COLORANTS. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2005;55(2):107-16.
46. Trouillas P, Sancho-Garcia JC, De Freitas V, Gierschner J, Otyepka M, Dangles O. Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment. *Chemical reviews*. 2016;116(9):4937-82.
47. Mori K, Goto-Yamamoto N, Kitayama M, Hashizume K. Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *Journal of experimental botany*. 2007;58(8):1935-45.
48. West ME, Mauer LJ. Color and chemical stability of a variety of anthocyanins and ascorbic acid in solution and powder forms. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013;61(17):4169-79.
49. Patras A, Brunton NP, O'Donnell C, Tiwari BK. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*. 2010;21(1):3-11.
50. Khoo HE, Chew LY, Ismail A, Azlan A. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources and Health Benefits: Anthocyanins in purple colored fruits. New York,: Nova Science Publishers; 2012.
51. Coutinho IB, Freitas A, Maçanita AL, Lima JC. Effect of water content on the acid–base equilibrium of cyanidin-3-glucoside. *Food Chemistry*. 2015;172:476-80.
52. Iosub I, Kajzar F, Makowska-Janusik M, MEGHEA A, GEANA I, RAU I. Electronic structure, optical and electrochemical properties of malvidin molecule extracted from grapes. *Display Imaging*. 2014;1:175-93.
53. Pérez-Gregorio RM, García-Falcón MS, Simal-Gándara J, Rodrigues AS, Almeida DPF. Identification and quantification of flavonoids in traditional cultivars of red and white onions at harvest. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2010;23(6):592-8.
54. Li D, Wang P, Luo Y, Zhao M, Chen F. Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2017;57(8):1729-41.
55. Boeing H, Bechthold A, Bub A, Ellinger S, Haller D, Kroke A, et al. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *European journal of nutrition*. 2012;51(6):637-63.
56. Hartley L, Igbinedion E, Holmes J, Flowers N, Thorogood M, Clarke A, et al. Increased consumption of fruit and vegetables for the primary prevention of cardiovascular diseases. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013(6):Cd009874.
57. Kelley DS, Rasooly R, Jacob RA, Kader AA, Mackey BE. Consumption of Bing sweet cherries lowers circulating concentrations of inflammation markers in healthy men and women. *J Nutr*. 2006;136(4):981-6.
58. Hubbard GP, Wolfram S, de Vos R, Bovy A, Gibbins JM, Lovegrove JA. Ingestion of onion soup high in quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in man: a pilot study. *The British journal of nutrition*. 2006;96(3):482-8.
59. O'Kennedy N, Crosbie L, Whelan S, Luther V, Horgan G, Broom JI, et al. Effects of tomato extract on platelet function: a double-blinded crossover study in healthy humans. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;84(3):561-9.
60. Erlund I, Koli R, Alfthan G, Marniemi J, Puukka P, Mustonen P, et al. Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;87(2):323-31.

61. Watzl B, Kulling SE, Moseneder J, Barth SW, Bub A. A 4-wk intervention with high intake of carotenoid-rich vegetables and fruit reduces plasma C-reactive protein in healthy, nonsmoking men. *The American journal of clinical nutrition*. 2005;82(5):1052-8.
62. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*. 2000;63(7):1035-42.
63. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in enzymology*. 1990;186:343-55.
64. Wang H, Cao G, Prior RL. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1997;45(2):304-9.
65. Stintzing FC, Stintzing AS, Carle R, Frei B, Wrolstad RE. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2002;50(21):6172-81.
66. Terahara N, Callebaut A, Ohba R, Nagata T, Ohnishi-Kameyama M, Suzuki M. Acylated anthocyanidin 3-sophoroside-5-glucosides from *Ajuga reptans* flowers and the corresponding cell cultures. *Phytochemistry*. 2001;58(3):493-500.
67. Tsuda T, Shiga K, Ohshima K, Kawakishi S, Osawa T. Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochemical pharmacology*. 1996;52(7):1033-9.
68. Brown JE, Kelly MF. Inhibition of lipid peroxidation by anthocyanins, anthocyanidins and their phenolic degradation products. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2007;109(1):66-71.
69. Goodwin AM. In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvascular research*. 2007;74(2-3):172-83.
70. Xue Y, Lim S, Brakenhielm E, Cao Y. Adipose angiogenesis: quantitative methods to study microvessel growth, regression and remodeling in vivo. *Nature protocols*. 2010;5(5):912-20.
71. Roy S, Khanna S, Alessio HM, Vider J, Bagchi D, Bagchi M, et al. Anti-angiogenic property of edible berries. *Free radical research*. 2002;36(9):1023-31.
72. Rechner AR, Kroner C. Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. *Thrombosis research*. 2005;116(4):327-34.
73. Toufektsian MC, de Lorgeril M, Nagy N, Salen P, Donati MB, Giordano L, et al. Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia-reperfusion injury. *J Nutr*. 2008;138(4):747-52.
74. Curtis PJ, Kroon PA, Hollands WJ, Walls R, Jenkins G, Kay CD, et al. Cardiovascular disease risk biomarkers and liver and kidney function are not altered in postmenopausal women after ingesting an elderberry extract rich in anthocyanins for 12 weeks. *J Nutr*. 2009;139(12):2266-71.
75. de Ferrars RM, Cassidy A, Curtis P, Kay CD. Phenolic metabolites of anthocyanins following a dietary intervention study in post-menopausal women. *Molecular nutrition & food research*. 2014;58(3):490-502.
76. Wang LS, Hecht SS, Carmella SG, Yu N, Larue B, Henry C, et al. Anthocyanins in black raspberries prevent esophageal tumors in rats. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa)*. 2009;2(1):84-93.
77. Bagchi D, Sen CK, Bagchi M, Atalay M. Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry Biokhimia*. 2004;69(1):75-80, 1 p preceding 75.
78. Bunea A, Rugina D, Sconta Z, Pop RM, Pintea A, Socaciu C, et al. Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells. *Phytochemistry*. 2013;95:436-44.
79. Faria A, Pestana D, Teixeira D, de Freitas V, Mateus N, Calhau C. Blueberry anthocyanins and pyruvic acid adducts: anticancer properties in breast cancer cell lines. *Phytotherapy research : PTR*. 2010;24(12):1862-9.
80. Jayaprakasam B, Vareed SK, Olson LK, Nair MG. Insulin Secretion by Bioactive Anthocyanins and Anthocyanidins Present in Fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005;53(1):28-31.

81. Takikawa M, Inoue S, Horio F, Tsuda T. Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J Nutr.* 2010;140(3):527-33.
82. Miyake S, Takahashi N, Sasaki M, Kobayashi S, Tsubota K, Ozawa Y. Vision preservation during retinal inflammation by anthocyanin-rich bilberry extract: cellular and molecular mechanism. *Laboratory Investigation.* 2011;92:102.
83. Shim SH, Kim JM, Choi CY, Kim CY, Park KH. Ginkgo biloba extract and bilberry anthocyanins improve visual function in patients with normal tension glaucoma. *Journal of medicinal food.* 2012;15(9):818-23.
84. Ohguro H, Ohguro I, Katai M, Tanaka S. Two-year randomized, placebo-controlled study of black currant anthocyanins on visual field in glaucoma. *Ophthalmologica Journal international d'ophtalmologie International journal of ophthalmology Zeitschrift fur Augenheilkunde.* 2012;228(1):26-35.
85. Tsuda T, Horio F, Uchida K, Aoki H, Osawa T. Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *J Nutr.* 2003;133(7):2125-30.
86. Tsuda T, Ueno Y, Aoki H, Koda T, Horio F, Takahashi N, et al. Anthocyanin enhances adipocytokine secretion and adipocyte-specific gene expression in isolated rat adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications.* 2004;316(1):149-57.
87. Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents.* 2005;26(5):343-56.
88. Pojer E, Mattivi F, Johnson D, Stockley CS. The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2013;12(5):483-508.
89. Tarozzi A, Morroni F, Hrelia S, Angeloni C, Marchesi A, Cantelli-Forti G, et al. Neuroprotective effects of anthocyanins and their in vivo metabolites in SH-SY5Y cells. *Neuroscience letters.* 2007;424(1):36-40.
90. Li D, Wang P, Luo Y, Zhao M, Chen F. Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57(8):1729-41.
91. Youdim KA, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free radical biology & medicine.* 2004;37(11):1683-93.
92. Strathearn KE, Yousef GG, Grace MH, Roy SL, Tambe MA, Ferruzzi MG, et al. Neuroprotective effects of anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinsons disease. *Brain research.* 2014;1555:60-77.
93. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free radical biology & medicine.* 2004;36(7):838-49.
94. Neuhouser ML. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutrition and cancer.* 2004;50(1):1-7.
95. Santos-Buelga C, Scalbert A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2000;80(7):1094-117.
96. Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Concentrations of Anthocyanins in Common Foods in the United States and Estimation of Normal Consumption. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2006;54(11):4069-75.
97. Bhagwat S, Haytowitz DB, Wasswa-Kintu SI, Holden JM. USDA Develops a Database for Flavonoids to Assess Dietary Intakes. *Procedia Food Science.* 2013;2:81-6.
98. Zamora-Ros R, Knaze V, Luján-Barroso L, Slimani N, Romieu I, Touillaud M, et al. Estimation of the intake of anthocyanidins and their food sources in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *British Journal of Nutrition.* 2011;106(7):1090-9.
99. Beking K, Vieira A. An assessment of dietary flavonoid intake in the UK and Ireland. *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* 2011;62(1):17-9.

100. Fang J. Classification of fruits based on anthocyanin types and relevance to their health effects. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif). 2015;31(11-12):1301-6.
101. Armelagos GJ. Brain Evolution, the Determinates of Food Choice, and the Omnivore's Dilemma. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2014;54(10):1330-41.
102. Carmody RN, Weintraub GS, Wrangham RW. Energetic consequences of thermal and nonthermal food processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(48):19199-203.
103. Pellegrini N, Fogliano V. Cooking, industrial processing and caloric density of foods. *Current Opinion in Food Science*. 2017;14:98-102.
104. Hotz C, Gibson RS. Traditional Food-Processing and Preparation Practices to Enhance the Bioavailability of Micronutrients in Plant-Based Diets. *The Journal of Nutrition*. 2007;137(4):1097-100.
105. Manios SG, Skandamis PN. Effect of frozen storage, different thawing methods and cooking processes on the survival of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 in commercially shaped beef patties. *Meat science*. 2015;101:25-32.
106. Song J, Park J, Jung J, Lee C, Gim SY, Ka H, et al. Analysis of Trans Fat in Edible Oils with Cooking Process. *Toxicological research*. 2015;31(3):307-12.
107. Vinha AF, Alves RC, Barreira SV, Costa AS, Oliveira MB. Impact of boiling on phytochemicals and antioxidant activity of green vegetables consumed in the Mediterranean diet. *Food & function*. 2015;6(4):1157-63.
108. Gray PJ, Conklin SD, Todorov TI, Kasko SM. Cooking rice in excess water reduces both arsenic and enriched vitamins in the cooked grain. *Food additives & contaminants Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*. 2016;33(1):78-85.
109. Stavric B. Biological significance of trace levels of mutagenic heterocyclic aromatic amines in human diet: a critical review. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 1994;32(10):977-94.
110. Pfau W, Martin FL, Cole KJ, Venitt S, Phillips DH, Grover PL, et al. Heterocyclic aromatic amines induce DNA strand breaks and cell transformation. *Carcinogenesis*. 1999;20(4):545-51.
111. Barham P, Villar MH. *A ciência da culinária*: Roca; 2002.
112. Fabbri ADT, Crosby GA. A review of the impact of preparation and cooking on the nutritional quality of vegetables and legumes. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. 2016;3:2-11.
113. Crosby G. *The science of good cooking*. Brookline, Massachusetts: America's Test Kitchen; 2012.
114. Howard LR, Prior RL, Liyanage R, Lay JO. Processing and Storage Effect on Berry Polyphenols: Challenges and Implications for Bioactive Properties. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2012;60(27):6678-93.
115. Brownmiller C, Howard LR, Prior RL. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *Journal of food science*. 2008;73(5):H72-9.
116. Brownmiller C, Howard LR, Prior RL. Processing and Storage Effects on Procyanidin Composition and Concentration of Processed Blueberry Products. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57(5):1896-902.
117. Li W, Pickard MD, Beta T. Effect of thermal processing on antioxidant properties of purple wheat bran. *Food Chemistry*. 2007;104(3):1080-6.
118. Rosales-Soto MU, Powers JR, Alldredge JR. Effect of mixing time, freeze-drying and baking on phenolics, anthocyanins and antioxidant capacity of raspberry juice during processing of muffins. *J Sci Food Agric*. 2012;92(7):1511-8.
119. Li J, Walker CE, Faubion JM. Acidulant and oven type affect total anthocyanin content of blue corn cookies. *J Sci Food Agric*. 2011;91(1):38-43.
120. Tian J, Chen J, Lv F, Chen S, Chen J, Liu D, et al. Domestic cooking methods affect the phytochemical composition and antioxidant activity of purple-fleshed potatoes. *Food Chemistry*. 2016;197, Part B:1264-70.

121. Yuan GF, Sun B, Yuan J, Wang QM. Effects of different cooking methods on health-promoting compounds of broccoli. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2009;10(8):580-8.
122. Sun H, Mu T, Xi L, Song Z. Effects of domestic cooking methods on polyphenols and antioxidant activity of sweet potato leaves. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2014;62(36):8982-9.
123. Hwang IG, Shin YJ, Lee S, Lee J, Yoo SM. Effects of Different Cooking Methods on the Antioxidant Properties of Red Pepper (*Capsicum annum L.*). *Preventive nutrition and food science*. 2012;17(4):286-92.
124. Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2002;50(10):3010-4.
125. Faller ALK, Fialho E. The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic cooking. *Food Research International*. 2009;42(1):210-5.
126. Palermo M, Pellegrini N, Fogliano V. The effect of cooking on the phytochemical content of vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014;94(6):1057-70.
127. Delgado-Vargas F, Jimenez AR, Paredes-Lopez O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains--characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2000;40(3):173-289.
128. Francis FJ. Food colorants: anthocyanins. *Critical reviews in food science and nutrition*. 1989;28(4):273-314.
129. Podsedek A, Sosnowska D, Redzynia M, Koziolkiewicz M. Effect of domestic cooking on the red cabbage hydrophilic antioxidants. *Int J Food Sci Technol*. 2008;43(10):1770-7.
130. Singh L, Varshney JG, Agarwal T. Polycyclic aromatic hydrocarbons' formation and occurrence in processed food. *Food Chem*. 2016;199:768-81.
131. Ledesma E, Rendueles M, Diaz M. Benzo(a)pyrene penetration on a smoked meat product during smoking time. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2014;31(10):1688-98.
132. Orecchio S, Ciotti VP, Culotta L. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coffee brew samples: Analytical method by GC-MS, profile, levels and sources. *Food and Chemical Toxicology*. 2009;47(4):819-26.
133. Iwegbue CMA, Onyonyewoma UA, Bassey FI, Nwajei GE, Martincigh BS. Concentrations and Health Risk of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Some Brands of Biscuits in the Nigerian Market. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. 2015;21(2):338-57.
134. EFSA. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. *The EFSA Journal*. 2008;724:1-114.
135. Viegas O, Novo P, Pinto E, Pinho O, Ferreira IM. Effect of charcoal types and grilling conditions on formation of heterocyclic aromatic amines (HAs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in grilled muscle foods. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2012;50(6):2128-34.
136. Rose M, Holland J, Dowding A, Petch SR, White S, Fernandes A, et al. Investigation into the formation of PAHs in foods prepared in the home to determine the effects of frying, grilling, barbecuing, toasting and roasting. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2015;78:1-9.
137. Viegas O, Yebra-Pimentel I, Martinez-Carballo E, Simal-Gandara J, Ferreira IM. Effect of beer marinades on formation of polycyclic aromatic hydrocarbons in charcoal-grilled pork. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2014;62(12):2638-43.
138. EFSA. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA Journal*. 2008;6(8):724.
139. Janoszka B. HPLC-fluorescence analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in pork meat and its gravy fried without additives and in the presence of onion and garlic. *Food Chemistry*. 2011;126(3):1344-53.

140. Wang C, Xie YT, Qi J, Yu Y, Bai Y, Dai C, et al. Effect of Tea Marinades on the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons in charcoal-grilled chicken wings. *Food Control*. 2018;93:325-33.
141. Farhadian A, Jinap S, Faridah A, Zaidul ISM. Effects of marinating on the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons (benzo[a]pyrene, benzo[b]fluoranthene and fluoranthene) in grilled beef meat. *Food Control*. 2012;28(2):420-5.
142. Gong G, Zhao X, Wu S. Effect of natural antioxidants on inhibition of parent and oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in Chinese fried bread youtiao. *Food Control*. 2018;87:117-25.
143. Wang C, Xie Y, Qi J, Yu Y, Bai Y, Dai C, et al. Effect of Tea Marinades on the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons in charcoal-grilled chicken wings. *Food Control*. 2018;93:325-33.
144. Weisburger JH, Nagao M, Wakabayashi K, Oguri A. Prevention of heterocyclic amine formation by tea and tea polyphenols. *Cancer Letters*. 1994;83(1):143-7.
145. Wang C, Xie Y, Wang H, Bai Y, Dai C, Li C, et al. The influence of natural antioxidants on polycyclic aromatic hydrocarbon formation in charcoal-grilled chicken wings. *Food Control*. 2019;98:34-41.
146. Kılıç Büyükkurt Ö, Aykın Dinçer E, Burak Çam İ, Candal C, Erbaş M. The Influence of Cooking Methods and Some Marinades on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Formation in Beef Meat. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 2017:1-11.
147. Melo A, Viegas O, Petisca C, Pinho O, Ferreira IM. Effect of beer/red wine marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines in pan-fried beef. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56(22):10625-32.