

Novos corantes alimentares: do estudo da interação de metais com antocianinas à descoberta de novas moléculas

Sara Alves

Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar

Departamento de Química e Bioquímica

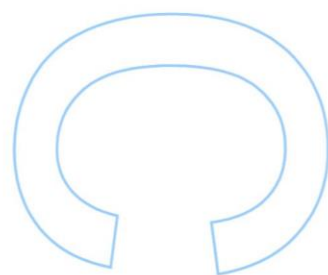
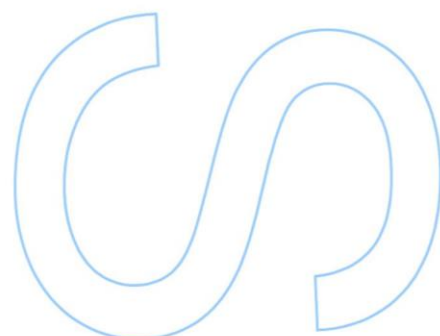
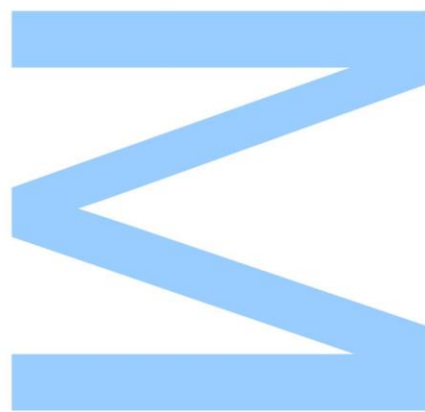
2021

Orientador

Doutora Natércia Teixeira, LAQV-REQUIMTE, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Coorientador

Professor Doutor Vítor de Freitas, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

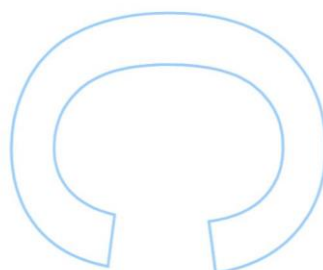
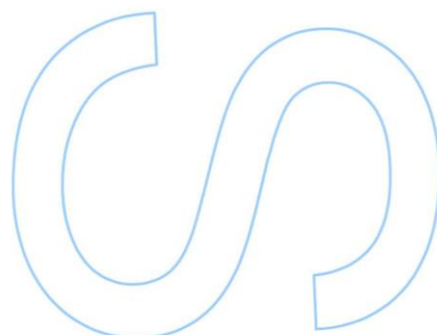
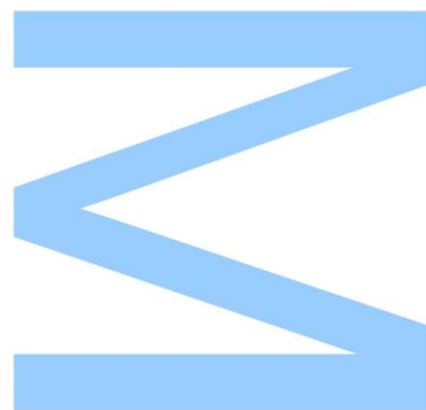




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

A realização deste trabalho não seria possível sem a ajuda e apoio de muitas pessoas. Gostaria de agradecer em particular:

À Doutora Natércia Teixeira, minha orientadora, por todo o carinho, paciência, ajuda ao longo deste ano; por ter aceitado o enorme desafio de orientar uma bióloga, por me ter transmitido o seu gosto pelo que faz e por me ter dado a possibilidade de aprender com ela.

Ao Professor Doutor Vítor de Freitas e Professor Doutor Nuno Mateus por me receberem no seu laboratório e por me acolherem em ano de tese.

Às minhas colegas de mestrado e de tese, Filipa Campos e Inês Pereira que rapidamente se tornaram amigas. Por toda a ajuda ao longo deste ano, por toda a cumplicidade e pelo encorajamento para assumir este desafio.

À Doutora Hileia de Souza pelas palavras de carinho, de simpatia e ajuda ao longo do ano.

A todas as pessoas do Food Polyphenol Lab por toda a disponibilidade e simpatia.

À professora Olga Maria Lage por me abrir novamente as portas do seu laboratório e por me acolher com toda a sua simpatia, tornou-se sem dúvida uma amiga.

A todas as pessoas do LEMUP, em particular ao José Santos, Inês Vitorino e Susana João por toda a ajuda nos diversos ensaios que realizaram comigo e ao Ricardo Pires por toda a amizade, paciência e ajuda ao longo do meu percurso académico.

Gostava também de agradecer a pessoas que não estiveram diretamente relacionadas com o meu trabalho, mas que contribuíram de alguma forma para que fosse possível

Aos melhores amigos que a faculdade me podia ter dado, Dino, Franco, Mafalda, Marta, Raquel, Miguel, Cláudia, Mónica, Aníbal e Camila, pelo prazer que foi partilhar esta jornada com eles.

Ao Luís e Filipa, por todas as longas conversas, gargalhadas e bons momentos que passámos juntos, por terem criado um segundo significado de família.

A todos os meus amigos de sempre que me apoiaram de alguma forma ao longo deste tempo, por todos os momentos académicos partilhados.

Por fim e mais importante, gostava de deixar um obrigada a toda a minha família e ao meu namorado. Aos meus pais que sempre foram os meus pilares, os meus melhores amigos e as pessoas que mais acreditam em mim. Obrigada por todas as lições valiosas que me passaram ao longo dos anos, foram os meus melhores professores. Aos meus avós, os meus segundos pais, um enorme obrigada por todo o apoio e por todo o amor. Ao meu namorado que me apoiou e ajudou em todos os bons e maus momentos, por todo o carinho, paciência e amor.

Resumo

Os corantes naturais têm registado um crescente interesse por parte da indústria alimentar devido à procura do consumidor por ingredientes naturais e funcionais em alimentos e bebidas. Porém, apesar de existirem alternativas que são atualmente usadas como corantes naturais, existem muito poucas para a cor azul. As antocianinas surgem como opção por possuírem esta cor a pHs mais altos, no entanto, apresentam uma falta de estabilidade que é afetada por diversos fatores durante o seu processamento e armazenamento.

Para testar e analisar uma possível solução para potenciar a estabilidade de cor da antocianina procedeu-se à síntese de complexos metal-antocianina: obteve-se um extrato rico em cianidina-3-glucósido e sintetizaram-se complexos com AlCl_3 e FeCl_3 a diferentes pHs que foram analisados por espectrofotometria. Os mesmos complexos evidenciaram formação de precipitado, revelando instabilidade na cor, mais acentuada nos complexos de ferro. Desta forma foi adicionada aos complexos goma arábica de forma a estabilizar a cor dos mesmos e a formação de precipitado. Os complexos, a diferentes pHs entre 3,7 e 5,6, foram submetidos a ensaios de degradação térmica sendo que foi possível observar uma maior estabilidade de cor nos complexos sintetizados a pH inferior. Também foram feitos ensaios de manutenção de cor com os complexos liofilizados e sintetizados com extrato bruto da amostra biológica usada. Apesar de apresentarem uma intensidade mais baixa foi possível observar complexação metálica de ambos os ensaios. O potencial antimicrobiano em *E.coli* e *S.aureus* dos complexos também foi testado tendo concluído que não apresentaram atividade antimicrobiana para as estirpes testadas.

A *Chrozophora tinctoria* também surge como alternativa aos corantes sintéticos azuis pela sua coloração atrativa e propriedades documentadas. Realizaram-se também ensaios antimicrobianos com um extrato de *Chrozophora tinctoria*, que evidenciaram uma atividade antimicrobiana significativa muito superior para *S.aureus* do que para *E.coli*.

Palavras-chave: antocianinas, cianidina-3-glucósido, corantes alimentares naturais, metais, complexos metal-antocianina, *Chrozophora tinctoria*

Abstract

Over the past decades, it was possible to observe an increasing interest in natural food colorants, due to a growing consumer demand for natural and functional ingredients in food products and beverages. Although there are alternatives currently being used as natural food colorants, there are few options for the blue color. Anthocyanins appear as an option, because they present this color at high pH values. However, they also show lack of stability, during their processing and storage influenced by several factors.

The aim of this study was to test and analyze a possible solution to enhance the color stability of anthocyanins through the synthesis of metal-anthocyanin complexes. An extract rich in cyanidin-3-glucoside was obtained and metal complexes with AlCl_3 and FeCl_3 were prepared at different pH values and their stability was monitored by spectrophotometry. These complexes revealed precipitate formation and color instability, more pronounced in the ones with iron in their composition. In order to try to stabilize their color and prevent the precipitate formation, gum arabic was added to the complexes. Thermal degradation assays were carried out with metal complexes synthesized at pH between 3.7 and 5.6 in which was possible to observe a greater color stability in samples synthesized at a lower pH. Color maintenance tests were also performed with lyophilized complexes and with crude extract from the biological material used. Despite presenting a lower intensity, it was possible to observe metal complexation on both tests. The antimicrobial potential in *E. coli* and *S. aureus* of each complex was also tested concluding that antimicrobial activity was not observed for the tested strains.

Chrozophora tinctoria also appears as an interesting alternative to blue synthetic dyes due to its attractive color and documented properties. Results from the antimicrobial assays with an extract obtained from *Chrozophora tinctoria*, showed a significantly higher antimicrobial activity for *S. aureus* than for *E. coli*.

Key words: anthocyanins, cyanidine-3-glucoside, metals, natural food colorants, metals metal complexes, *Chrozophora tinctoria*

Índice

Agradecimentos	3
Resumo	5
Abstract	7
Índice	9
Lista de Figuras	13
Lista de Tabelas	17
Lista de Abreviaturas	19
I. Introdução	20
1.1. Enquadramento	20
1.1.1. O papel do consumidor no desenvolvimento de novos produtos	21
1.2. Corantes Alimentares	22
1.2.1. Alternativas naturais aos Corantes Alimentares sintéticos	24
1.3. Compostos Polifenólicos	26
1.3.1. Estrutura Química	26
1.3.2. Propriedades e Aplicações	27
1.3.3. Antocianinas	28
1.3.3.1. Estrutura Química	29
1.3.3.2. Fatores que afetam a estabilidade das antocianinas	31
1.3.3.2.1. pH	31
1.3.3.2.2. Temperatura	32
1.3.3.2.3. Outros fatores	33
1.3.3.3. Mecanismos de estabilização das antocianinas	33
1.3.3.3.1. Técnicas de encapsulação	33
1.3.3.3.2. Reações de associação	34
1.3.3.3.2.1. Copigmentação	34

1.3.3.3.2.2. Complexação metálica	35
1.4. Compostos não Polifenólicos	37
1.4.1. <i>Chrozophora Tinctoria</i>	37
1.4.1.1. Aplicações na Época Medieval	38
1.4.1.2. Propriedades Medicinais.....	39
1.4.1.3. Composição	39
Objetivos	42
II. Materiais e métodos	44
2.1. Reagentes	44
2.2. Preparação do extrato.....	44
2.2.1. Obtenção do Extrato Antociânico	44
2.2.2 Caracterização dos extratos antociânicos.....	46
2.2.2.1. Quantificação do conteúdo total de fenóis.....	46
2.2.2.2. Quantificação de cianidina-3-glucósido nas diferentes frações extraídas	46
2.3. Preparação das soluções tampão	47
2.4. Síntese dos Complexos Antocianina-Metal	48
2.5. Adição de Goma Arábica nos complexos	48
2.6. Estudo da estabilidade da cor dos complexos	49
2.6.1. Liofilização e posterior ressuspensão dos complexos	49
2.6.2. Degradação Térmica.....	50
2.6.3. Cinéticas	50
2.6.4. Extrato Bruto	50
2.7. Cálculo das coordenadas de cor do CIE L*a*b*.....	50
2.8. Ensaio Antimicrobianos	52
2.8.1. Preparação dos Complexos para os Ensaio	52
2.8.1.1 Ensaio de Atividade Antimicrobiana.....	52

2.8.2.	Material Biológico e condições das culturas	53
2.8.3	Obtenção do Extrato de <i>Chrozophora tinctoria</i>	54
III.	Resultados e Discussão	57
3.1.	Caracterização dos extratos antociânicos	57
3.1.1.	Massa obtida para cada extrato	57
3.1.2.	Quantificação do conteúdo total de fenóis	57
3.1.2.1.	Quantificação de cianidina-3-glucósido nas diferentes frações extraídas	58
3.2.	Escolha do tampão e do intervalo de valores de pH.....	61
3.3.	Síntese dos complexos Antocianina-Metal	62
3.3.1.	Estudo da precipitação	65
3.3.1.1.	Realização de cinéticas	65
3.3.2.	Adição de Goma Arábica.....	71
3.3.2.1.	Seleção da percentagem de goma arábica (% (m/m)).....	72
3.3.2.2.	Realização de cinéticas	74
3.4.	Ensaio de estabilidade de cor	78
3.4.1.	Extrato Bruto.....	78
3.4.2.	Degradação térmica	80
3.4.3.	Liofilização dos complexos antocianina-metal	87
3.4.3.1.	Medição dos valores de pH	89
3.5.	Atividade Anti-microbiana dos Complexos Metal-Antociânicos	90
3.6.	Atividade Anti-microbiana da <i>Chrozophora tinctoria</i>	92
	Conclusões	96
	Bibliografia	99

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema da classificação dos corantes alimentares (adaptado de (Janiszewska-Turak, E., Pisarska, A., & Królczyk, 2016)).....	22
Figura 2 Estrutura química do Azul Brilhante FCF (A) e do Índigo-Carmim (B). Adaptado de (Newsome et al., 2014).	25
Figura 3 Estrutura química básica dos flavonoides (Adaptada de (Behling et al., 2008)).	27
Figura 4. Estrutura química de exemplos de não flavonoides. (A). Ácido Benzoico (B). Ácido Cinâmico (Adaptada de (Liu et al., 2020)).	27
Figura 5. Estrutura generalizada das antocianinas, [R1 and R2 = H, OH, ou OMe; substituição glicosídica nos carbono 3, 5 ou 7; possível acilação nos açúcares (adaptado de (Krga & Milenkovic, 2019; Wrolstad & Culver, 2012)).	30
Figura 6. Principais espécies de equilíbrio das antocianinas: base quinoidal (QB), o catião flavílio (FC), pseudobase ou carbinol (FC) e chalcona (CH) (Adaptado de (Fernandes et al., 2014)).	32
Figura 7. Configuração/Esquema/Conformação dos complexos nos diferentes tipos de copigmentação (A- antocianina; C- copigmento) (adaptado de (Escribano-Bailon & Santos-Buelga, 2012)).	35
Figura 8. Estrutura generalizada do complexo antocianina-metal (Adaptado de (Yoshida et al., 2009)).	36
Figura 9. Fotografia dos frutos de <i>C. tinctoria</i> (adaptado de (Nabais et al., 2020))....	38
Figura 10. Estrutura da hermidina e do seu derivado, a crozoforidina - composto responsável pela cor azul da tinta obtida da <i>Chrozophora tinctoria</i> (Adaptado de (Nabais et al., 2020)).	40
Figura 11. Estrutura de cor CIELAB. Adaptado de (Cortez et al., 2017).	52
Figura 12. Culturas das estirpes utilizadas como material biológico nos ensaios antimicrobianos. (A) <i>E. coli</i> ATCC 25922; (B) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213. .	54
Figura 13. Reta de calibração obtida para a Cianidina-3-glucósido.	59
Figura 14. Cromatograma obtido por análise HPLC-DAD para o Extrato Bruto utilizado (Extrato Bruto 2ª Extração).	59
Figura 15. Cromatograma obtido por análise HPLC-DAD para a Fração obtida com 10% MeOH.	60

Figura 16. Coloração dos complexos de Ferro (A) e Alumínio (B) a pH 4,6.....	62
Figura 17. Coloração dos complexos de Ferro e cianidina-3-glucósido pH 3,7 0h (A), 120 min (B) e 180 min (C).....	63
Figura 18 Coloração dos complexos de Alumínio e cianidina-3-glucósido pH 3,7 (A) e pH (4) 20 minutos depois da síntese do complexo.....	63
Figura 19. Valores de L* (A), a* (B) e b* (C) dos complexos de Antocianina-Alumínio e Antocianina-Ferro com Goma Arábica 0,7% 0h e 24h após a formação dos complexos a pH 3,7. * p < 0,05, diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes condições dos extratos.	64
Figura 20. Distribuição das Frações Molares das espécies em equilíbrio da Cianidina-3-Glucósido em função do pH em água: Catião Flavílio (AH ⁺), cis-Chalcona (Cs), trans-Chalcona (Ct), Base Quinoidal (A) e Forma Hemiacetal (B). (Adaptado de ((Cruz et al., 2020)).	66
Figura 21. Espectro de Absorção do Complexo de Alumínio-Cianidina durante 120 minutos pH 3,7. <i>Inset:</i> Variação da absorbância máxima do complexo Alumínio-Cianidina pH 3,7 durante 120 minutos.	66
Figura 22. Espectro de Absorção do Complexo de Alumínio-Cianidina durante 120 minutos pH 4. <i>Inset:</i> Variação da absorbância máxima do complexo Alumínio-Cianidina pH 4 durante 120 minutos.	67
Figura 23. Espectro de Absorção do Complexo de Alumínio-Cianidina durante 120 minutos pH 4,6. <i>Inset:</i> Variação da absorbância máxima do complexo Alumínio-Cianidina pH 4,6 durante 120 minutos.	67
Figura 24. Espectro de Absorção do Complexo de Alumínio-Cianidina durante 120 minutos pH 5,6. <i>Inset:</i> Variação da absorbância máxima do complexo Alumínio-Cianidina pH 5,6 durante 120 minutos.	68
Figura 25. Espectro de Absorção do Complexo de Ferro-Cianidina durante 120 minutos pH 3,7. <i>Inset:</i> <i>Inset:</i> Variação da absorbância máxima do complexo Ferro-Cianidina pH 3,7 durante 120 minutos.....	69
Figura 26. Espectro de Absorção do Complexo de Ferro-Cianidina durante 120 minutos pH 4,6. <i>Inset:</i> Variação da absorbância máxima do complexo Ferro-Cianidina pH 4,6 durante 120 minutos.....	70
Figura 27. Espectro de Absorção do Complexo de Ferro-Cianidina durante 120 minutos pH 5,6. <i>Inset:</i> Variação da absorbância máxima do complexo Ferro-Cianidina pH 5,6 durante 120 minutos.....	70

Figura 28. Complexo com ferro e antocianina pH 3,7 0h após a formação do complexo (A) e 2 horas depois (B).....	71
Figura 29. Valores de L* (A), a* (B) e b* (C) dos complexos de Antocianina-Alumínio e Antocianina-Ferro com Goma Arábica 0,7% 0h e 24h após a formação dos complexos a pH 3,7.	72
Figura 30. Valores de L (A), a (B) e b (c) dos complexos de Antocianina-Alumínio com diferentes percentagens (m/m) (0,2%,0,7% e 1% de Goma Arábica a pH 3,7). * p < 0,05, diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes condições dos extratos.	73
Figura 31. Valores de L (A), a (B) e b (c) dos complexos de Antocianina-Ferro com diferentes percentagens (m/m) (0,2%,0,7% e 1% de Goma Arábica a pH 3,7). * p < 0,05, diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes condições dos extratos.	73
Figura 32. Espectro de Absorção do Complexo de Alumínio-Cianidina com Goma Arábica 0,7% (m/m) durante 120 minutos pH 3,7. <i>Inset:</i> Variação da absorbância máxima do complexo Alumínio-Cianidina com G.A. 0,7% (m/m) pH 3,7 durante 120 minutos.	75
Figura 33. Espectro de Absorção do Complexo de Alumínio-Cianidina com Goma Arábica 0,7% durante 120 minutos pH 5,6. <i>Inset:</i> Variação da absorbância máxima do complexo Alumínio-Cianidina com G.A 0,7% pH 3,6 durante 120 minutos.....	76
Figura 34. Espectro de Absorção do Complexo de Ferro-Cianidina com Goma Arábica 0,7% durante 120 minutos pH 5,6. <i>Inset:</i> Variação da absorbância máxima do complexo Ferro-Cianidina com G.A 0,7% pH 5,6 durante 120 minutos.	77
Figura 35. Espectro de Absorção do Complexo de Ferro-Cianidina com Goma Arábica 0,7% durante 120 minutos pH 3,7. <i>Inset:</i> Variação da absorbância máxima do complexo Ferro-Cianidina com G.A 0,7% pH 3,7 durante 120 minutos	77
Figura 36. Valores de L* (a), a* (B) e b* (c) dos complexos com extrato bruto e Alumínio e Ferro a pH 3,7 0h e 24h após os complexos. * p < 0,05, diferenças estatisticamente significativas entre as <i>diferentes condições dos extratos</i>	78
Figura 37. Valores de L* (A), a* (B) e b* (C) dos complexos de Antocianina+ G.A. 0.7% a pH 3,7, 4, 4,6, 5,2 e 5,6 com o aumento de temperatura (20°C-100°C).	83
Figura 38. Valores de L* (A), a* (B) e b* (C) dos complexos de Antocianina + Alumínio com G.A. 0.7% a pH 3,7, 4, 4,6, 5,2 e 5,6 com o aumento de temperatura (20°C-100°C).....	84

Figura 39. Valores de L* (A), a* (B) e b* (C) dos complexos de Antocianina + Ferro com G.A. 0.7% a pH 3.7, 4, 4.6, 5.2 e 5.6 com o aumento de temperatura (20°C-100°C).....	85
Figura 40. Percentagem de crescimento de E.coli com diferentes concentrações dos complexos Antocianina+Alumínio e Antocianina+Ferro.	91
Figura 41. Percentagem de crescimento de S. aureus com diferentes concentrações dos complexos Antocianina+Alumínio e Antocianina+Ferro.	92
Figura 42. Percentagem de crescimento de E. coli com diferentes concentrações de extrato de <i>Chrozophora tinctoria</i>	93
Figura 43. Percentagem de crescimento de S. aureus com diferentes concentrações de extrato de <i>Chrozophora tinctoria</i>	93

Lista de Tabelas

Tabela 1. Cores comuns de diferentes compostos e os alimentos associados (adaptado de (Chaitanya Lakshmi G., 2014)).....	24
Tabela 2. Fórmula Química e comprimento de onda máximo (em água) dos corantes sintéticos atualmente usados em matrizes alimentares. Adaptado de (Newsome et al., 2014).....	25
Tabela 3. Diferentes concentrações de antocianinas em diversas fontes vegetais (adaptado de Mateus & Freitas, 2008)	29
Tabela 4. Diferentes concentrações de antocianinas em diversas fontes vegetais (adaptado de Mateus & Freitas, 2008).	30
Tabela 5. Gradiente de eluição dos diferentes solventes na análise por HPLC de antocianinas.....	45
Tabela 6. Equações usadas na determinação do teor de fenóis totais utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu.....	46
Tabela 7. Constituintes do tampão universal usados nos ensaios preliminares. (Para 100 mL) (Adaptado de base de dados Sigma-Aldrich).....	47
Tabela 8. Constituintes do tampão Acetato 0,2 M usado em todos os ensaios (Adaptado de base de dados Sigma-Aldrich).	47
Tabela 9. Síntese dos complexos utilizados nos diferentes ensaios. Adaptado de (Buchweitz, et al., 2012a).	49
Tabela 10. Constituintes do meio de cultura Nutrient Agar sólido para 1000 mL de meio.	54
Tabela 11. Massa (em mg) de cada fração obtida.....	57
Tabela 12. Concentração de compostos fenólicos totais nas diferentes frações previamente separadas após extração.....	57
Tabela 13. Valores de percentagem, concentração de cianidina-3-glucósido nos diferentes extratos e massa de extrato pesada (mg).	61
Tabela 14. Valores de ΔL , Δa , Δb e TDC (diferença total de cor) entre os complexos formados com extrato bruto-Alumínio e Cianidina-Alumínio a diferentes pHs.	79
Tabela 15. Valores de ΔL , Δa , Δb e TDC (diferença total de cor) entre os complexos formados com Extrato bruto-Ferro e Cianidina-Ferro e a diferentes pHs.....	80

Tabela 16. Valores de Diferença Total de Cor (TCD) para as diferentes temperaturas e valores de pH nos complexos Antocianina-Alumínio.....	86
Tabela 17. Valores de Diferença Total de Cor (TCD) para as diferentes temperaturas e valores de pH nos complexos Antocianina-Ferro.	86
Tabela 18. Valores de ΔL , Δa , Δb e TDC para os complexos Antocianina-Alumínio ressuspendidos em relação aos complexos iniciais a diferentes pHs.	88
Tabela 19. Valores de ΔL , Δa , Δb e TDC para os complexos Antocianina-Ferro ressuspendidos em relação aos complexos iniciais a diferentes pHs.	88
Tabela 20. Valores do pH dos tampões dos complexos de Antocianina-Alumínio antes e após serem liofilizados e ressuspendidos.	89
Tabela 21. Valores do pH dos tampões dos complexos de Antocianina-Ferro antes e após serem liofilizados e ressuspendidos.	90

Lista de Abreviaturas

- ACN: Acetonitrilo
- CIE: Commission International d'Eclairage
- CFT: Compostos fenólicos totais
- DLS: Dynamic Light Scattering
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- EMA/EMA: European Medicines Evaluation Agency
- FDA: Food and Drug Administration
- HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- L: Litros
- MeOH: Metanol
- Nm: Nanómetros
- RPM: Rotação por minuto
- TDC: Diferença Total de Cor
- λ_{max} : Comprimento de onda máximo de absorção

I. Introdução

1.1. Enquadramento

Regra geral, o consumidor tem um papel fulcral na escolha dos alimentos que consome, e tem de tomar regularmente um elevado número de decisões em relação aos mesmos –(Siegrist & Sütterlin, 2017). A resposta do ser humano nestas decisões relacionadas com a alimentação engloba diversos fatores, nomeadamente fatores bioquímicos, nutricionais e fisiológicos, abrangendo ainda fatores psicológicos e fatores relacionados com o marketing do produto (Cardello, 1994) . Em suma, a postura que um consumidor adota perante um alimento, não é apenas baseada nas características sensoriais do mesmo mas também está simultaneamente relacionada com informação prévia que o consumidor tem acerca do mesmo que o leva a criar uma ideia pré-concebida (Costell et al., 2010). Assim sendo, a produção de alimentos deve reunir os requisitos de qualidade do produto e ir de encontro às expetativas e preferências do consumidor (Carocho et al., 2014).

A qualidade de um produto engloba várias dimensões (qualidade objetiva e subjetiva), que influenciam de forma inerente a postura que o consumidor tem perante esse mesmo produto. A qualidade alimentar, é uma das maiores preocupações na indústria nas últimas décadas uma vez que a produção e consumo de alimentos é algo central a qualquer sociedade e tem uma grande influência económica. É definida pela Organização Internacional de Normalização (ISO) como a totalidade de características do produto que têm a capacidade/objetivo satisfazer as necessidades intrínsecas do mesmo. Deste modo, a qualidade pode ser também descrita como os requisitos necessários para satisfazer as necessidades e expetativas do consumidor sendo que estas podem variar com certos fatores (género, idade, fatores culturais, educação entre outros) (Costell et al., 2010; Aung & Chang, 2014).

O conceito de qualidade abrange duas grandes dimensões: a qualidade objetiva que se refere a características físicas do produto e a qualidade subjetiva que se refere à qualidade considerada pelo consumidor sendo que a aparência do produto é a primeira perceção que o consumidor tem de qualquer bem alimentar (Grujić et al., 2013). A cor como tal, é um fator importante na aceitabilidade de produtos alimentares uma vez que possui uma influência direta na sua aparência. As pessoas associam

certas cores a determinados sabores sendo que a mesma a cor dos alimentos pode influenciar a percepção de sabor que é pré-concebida pelo consumidor. Para além disso a qualidade não se refere apenas às propriedades do produto em si mas também à forma como essas propriedades foram alcançadas (Delwiche, 2004). Os aditivos alimentares são intervenientes fundamentais nesta qualidade final do produto alimentar, uma vez que desempenham um papel importante na produção alimentar. Os aditivos podem ser substâncias naturais ou sintéticas e são adicionados para alcançar, modificar, e manter as características técnicas e sensoriais do produto, ou para incrementar a conveniência do mesmo para o consumidor (Grujić et al., 2013; Bearth et al., 2014).

1.1.1. O papel do consumidor no desenvolvimento de novos produtos

A posição do consumidor no mercado tem influência no desenvolvimento de um novo produto que juntamente com o mercado em crescimento justifica a necessidade de priorizar as necessidades, expectativas, preferências e comportamentos do consumidor (Grujić et al., 2013). Apesar da legislação não diferir para os aditivos alimentares de origem natural e de origem sintética, o consumidor tende a fazer distinção de ambos. Estudos anteriores que tinham como objetivo analisar a visão do consumidor em relação a aditivos alimentares usados na produção alimentar, revelaram que principalmente os de origem artificial representam uma fonte de ansiedade e insegurança para o consumidor (Bearth et al., 2014). Assim, há a necessidade de o mercado acompanhar as exigências e preferências do consumidor, procurando desenvolver produtos o mais naturais possível.

Existe um desejo considerável de utilizar ingredientes naturais funcionais em alimentos e bebidas devido a esta demanda do consumidor por rótulos mais “limpos”. As antocianinas que pertencem ao grande grupo dos flavonoides, são dos ingredientes naturais mais usados devido à sua coloração e potenciais benefícios para a saúde (Chung et al., 2016).

1.2. Corantes Alimentares

A Cor, sendo um parâmetro da aparência, tem de estar inserida numa determinada gama que determina o seu grau de aceitabilidade (Francis, 1995). Para satisfazer essa aceitabilidade, são utilizados regularmente aditivos de cor naturais e sintéticos na comida, fármacos e cosméticos. No que toca, mais precisamente às matrizes alimentares, a adição de compostos corantes tem diversas funções no produto final, nomeadamente assegurar a uniformidade entre lotes e ajudar a reforçar a cor que está naturalmente presente no produto mas que é perdida/degradada durante os processamentos a que foi submetido (Scotter, 2011).

Os corantes alimentares podem ser classificados de acordo com vários critérios: origem (natural, idêntico a natural ou sintético; orgânico e inorgânico), solubilidade (solúveis ou insolúveis) e capacidade de cobertura (transparente ou opaco) (**Figura 1**) (Amchova et al., 2015)

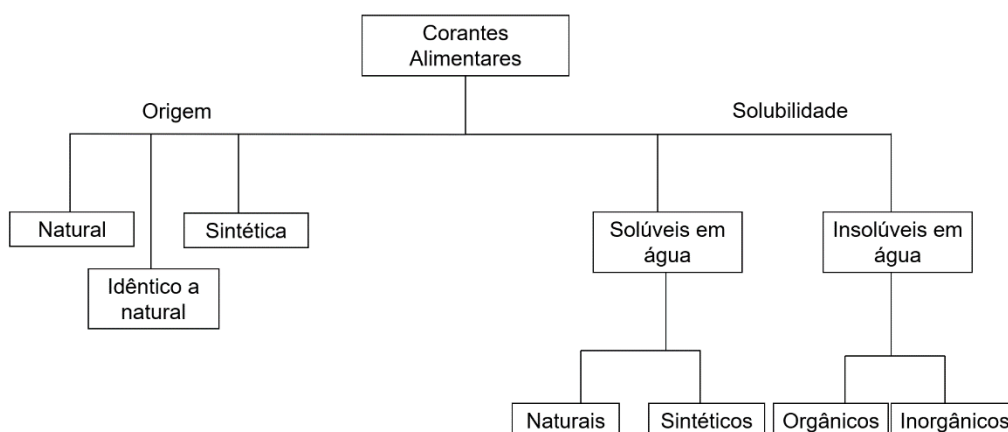


Figura 1. Esquema da classificação dos corantes alimentares (adaptado de (Janiszewska-Turak, E., Pisarska, A., & Królczyk, 2016))

Quanto à utilização destes aditivos, os corantes sintéticos são geralmente escolhidos devido às suas características apelativas, nomeadamente relação preço/qualidade e intensidade de cor (Okafor et al., 2016). Os corantes alimentares sintéticos têm sido muito utilizados em produtos alimentares ao longo dos anos, providenciando uma vasta gama de tons com alta estabilidade. Mais recentemente, o mercado dos corantes alimentares tem trabalhado no sentido de cada vez mais, substituir os

corantes alimentares sintéticos por alternativas de fonte natural (Sigurdson et al., 2017).

A indústria dos corantes alimentares tem registado uma tendência crescente no desenvolvimento de novos produtos, sendo constantemente desenvolvidos aditivos alimentares no mercado como forma de assegurar determinadas características dos produtos. Como referido anteriormente, a cor é um dos parâmetros indicadores de qualidade e segurança alimentar, e é uma das propriedades que se tenta assegurar ou melhorar. Desta forma é expectável que alimentos processados sejam atrativos em termos de cor (Scotter, 2011).

Destacando os corantes solúveis, estes podem ser subdivididos em corantes naturais, semissintéticos e sintéticos. Para além da preferência do consumidor face aos aditivos de origem natural, estudos anteriores vieram evidenciar efeitos adversos principalmente em crianças realçando estas inseguranças do consumidor. Primeiramente um estudo realizado por Feingold (1975) e mais tarde outro desenvolvido por Mccann et al. (2007) evidenciaram uma relação entre o consumo de corantes alimentares sintéticos, em alimentos e bebidas e a hiperatividade em crianças. O efeito do consumo de uma mistura de corantes alimentares sintéticos sobre o comportamento de grupos de crianças com idades entre os três e oito anos foi analisado, tendo os autores concluído que os valores de hiperatividade global agregada (GHA) aumentaram em alguns grupos de crianças que ingeriram a mistura em relação aos grupos controlo.

Quanto aos corantes naturais, existem vários que são utilizados no processamento de alimentos. Este tipo de aditivos naturais podem ser obtidos a partir de vários alimentos ou materiais naturais e/ou subprodutos como por exemplo a riboflavina (E101), as clorofilas (E140), os carotenos (E160a), as betalaínas (E162) ou as antocianinas (E163) (Amchova et al., 2015). No entanto, apesar de haver uma preferência de utilização dos pigmentos obtidos naturalmente são geralmente menos estáveis ao calor, luz e oxigénio (Wrolstad & Culver, 2012).

Tabela 1. Cores comuns de diferentes compostos e os alimentos associados (adaptado de (Chaitanya Lakshmi G., 2014)).

Cor	Cromóforo	Fonte Vegetal	Nutrientes
Azul-Roxo	Antocianinas	Beringela, Amora, Couve-Roxa, Ameixa, Uvas Passas, Uvas Roxas, Figo	Luteína, zeaxantina, resveratrol, vitamina C, flavonoides, ácido elágico, quercetina
Verde	Clorofila	Abacate, Brócolos, Pepino, Espinafres, Couve, Ervilha, Curgete, Alcachofra, Alface, Kiwi	Luteína, zeaxantina, vitamina C, cálcio, ácido fólico, β - caroteno
Branco	Antoxantinas	Couve-Flor, Cogumelos, Nabo, Batata, Gengibre, Cebola, Banana, Alho	Potássio, Selénio
Amarelo-Laranja	Carotenoides	Papaia, Ananás, Pêssego, Abóbora, Alperce, Laranja, Milho	β -caroteno, zeaxantina, flavonoides, vitamina C potássio
Vermelho	Licopeno ou Antocianinas	Arando, Beterraba, Melancia, Tomate, Morango, Romã	Ácido elágico, quercetina hesperidina, etc.

1.2.1. Alternativas naturais aos Corantes Alimentares sintéticos

A indústria de alimentos e bebidas tem procurado cada vez mais introduzir corantes alimentares naturais na matriz dos seus produtos. Alternativas para os corantes certificados têm vindo a ser discutidos ao longo de vários anos. As colorações amarelas, vermelhas e laranja são mais fáceis de produzir em corantes alimentares a partir de carotenoides ou antocianinas (Newsome et al., 2014; Sigurdson et al., 2017).

As alternativas para corantes de tonalidade azul podem incluir Antocianinas, Ficocianinas (pigmentos produzidos por cianobactérias), e compostos derivados e iridoides (monoterpenóides). No entanto, o uso destes compostos acarreta limitações na aplicação em matrizes alimentares nomeadamente relacionadas com restrições de legislação, estabilidade limitada ou inviabilidade de alcançar/igualar as tonalidades pretendidas (Sigurdson et al., 2017).

Na gama das tonalidades azuis são comumente utilizados dois compostos sintéticos em matrizes alimentares, o Azul Brilhante FCF e o Índigo carmim, que são descritos como **E133** e **E132** respetivamente na EMA/EMEA (European Medicines Evaluation Agency); são conhecidos também como FD&C blue no. 1 (1) e FD&C blue no. 2 (2) segundo a FDA (Food and Drug Administration) (**Figura 2**) (**Tabela 2**). No entanto, o indigo-carmim não é usado regularmente em bebidas devido à sua estabilidade insatisfatória (Newsome et al., 2014).

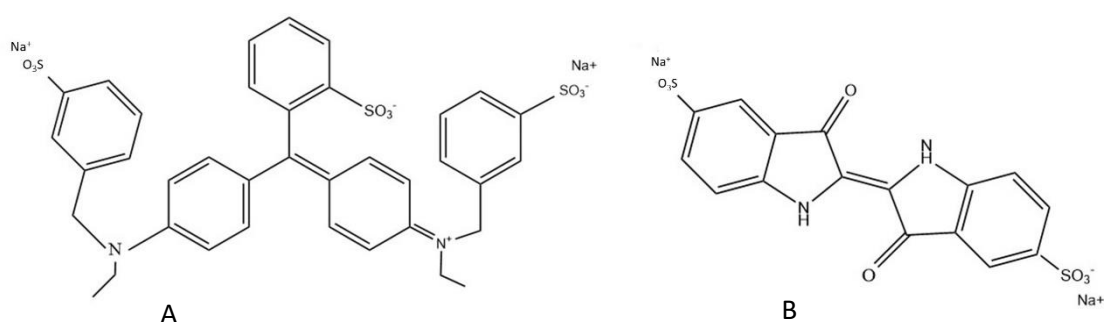


Figura 2 Estrutura química do Azul Brilhante FCF (A) e do Índigo-Carmim (B). Adaptado de (Newsome et al., 2014).

Tabela 2. Fórmula Química e comprimento de onda máximo (em água) dos corantes sintéticos atualmente usados em matrizes alimentares. Adaptado de (Newsome et al., 2014).

Nome do composto	Fórmula Química	λ_{max} (a) (nm)
FD&C blue no. 1	C ₃₇ H ₃₆ N ₂ O ₉ S ₃ Na ₂	629
FD&C blue no. 2	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ O ₈ S ₂ Na ₂	607

Até à data, não existe um substituto para o Azul brilhante que possa ser usado em bebidas e alimentos. Isto limita a gama de tonalidades azuis, verdes e roxas disponíveis para o desenvolvimento de novos produtos (Newsome et al., 2014).

Newsome et al. (2014) procurou fazer uma revisão detalhada de todos os pigmentos encontrados em plantas, animais, fungos e microrganismos e concluiu que nenhuma alternativa igualava os critérios de cor, brilho e estabilidade do Azul Brilhante FCF simultaneamente aos critérios de segurança alimentar, abundância e viabilidade económica (Roda-serrat et al., 2018).

As antocianinas constituem uma alternativa com grande potencial para a cor azul. Estas apresentam uma tonalidade azul com baixa intensidade numa gama de pH de 6 a 7. Outro precursor de uma tonalidade azul é a ficocianina. Jespersen et al. (2005) procurou comparar três corantes naturais no que diz respeito a estabilidade em diferentes matrizes alimentares e concluiu que, mesmo que nenhum fosse ideal, a ficocianina era a mais versátil (Roda-serrat et al., 2018). Também recentemente a Food and Drug Administration (FDA) aprovou a ficocianina como um extrato de spirulina. No entanto a sua utilização é limitada devido à sua falta de estabilidade a altas temperaturas, luz e variações de pH para além do seu custo elevado de produção (Neves et al., 2021).

1.3. Compostos Polifenólicos

Os Polifenóis são um grupo de compostos naturais com uma ampla distribuição em sementes, caules e flores de plantas e constituem a maior parte dos antioxidantes na dieta do ser humano (Coppo & Marchese, 2014; Scalbert et al., 2005a). Os compostos polifenólicos são metabolitos secundários de plantas, têm um papel importante na defesa das mesmas contra agentes patogénicos e contra predadores herbívoros, tais como contra condições de stress abiótico (Dabas, 2016; Daglia, 2012; Heim et al., 2002; Shoji, 2007; Zimon & Domingues, 2019).

1.3.1. Estrutura Química

No que diz respeito à sua estrutura química estão divididos em grupos de acordo com o número de anéis fenólicos e os elementos estruturais que ligam esses anéis: os flavonóides (que incluem, os flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas e as antocianidinas) e os não flavonóides (ácidos fenólicos essencialmente que se dividem em derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico e estilbenos) (Ferrera et al., 2016; Han et al., 2007; Liu et al., 2020).

Os flavonoides são compostos tricíclicos que possuem uma estrutura básica formada por um esqueleto C6-C3-C6 (Soares, 2002). Possuem dois anéis benzénicos (anéis A

e B) ligados a um anel pirano (anel C) (**Figura 3**) e os seus subgrupos podem variar dependendo do número de grupos hidroxilo e o carbono a que estão ligados podendo alterar a molécula base (Coppo & Marchese, 2014; Behling et al., 2008).

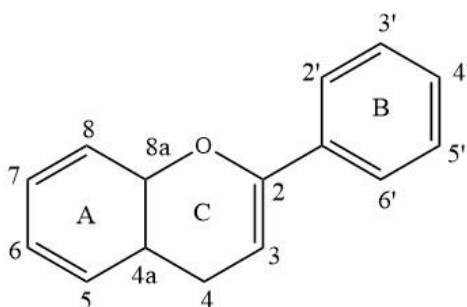


Figura 3 Estrutura química básica dos flavonoides (Adaptada de (Behling et al., 2008)).

Os compostos não flavonoides ou os ácidos fenólicos na sua maioria, caracterizam-se por possuírem um anel benzeno, um grupo carboxilo e um ou mais grupos hidroxilo e/ou metoxilo (**Figura 4**) (Soares, 2002). Estes compostos geralmente não possuem cor ou se possuem, é uma cor levemente acastanhada de modo que raramente contribuem diretamente para a cor do alimento (Shoji, 2007).

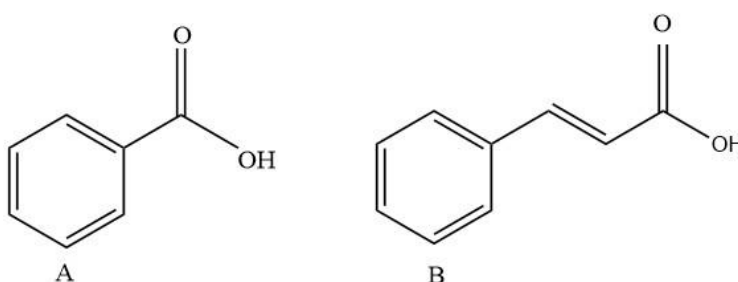


Figura 4. Estrutura química de exemplos de não flavonoides. (A). Ácido Benzoico (B). Ácido Cinâmico (Adaptada de (Liu et al., 2020)).

1.3.2. Propriedades e Aplicações

Algumas classes de polifenóis possuem propriedades antimicrobianas de modo que estes têm vindo a ser propostos no desenvolvimento de novos conservantes alimentares uma vez que a tendência do mercado é evitar conservantes alimentares sintéticos. Adicionalmente têm também sido propostos no desenvolvimento de terapias inovadoras para o tratamento de várias infeções microbianas (Daglia, 2012).

Além do interesse na sua atividade antimicrobiana, os polifenóis recentemente também têm despertado o interesse de nutricionistas devido às propriedades antioxidantes que possuem e devido ao seu papel na prevenção de diversas doenças (Scalbert et al., 2005). Estudos recentes evidenciaram a contribuição dos polifenóis na prevenção de doenças cardiovasculares, cancro, osteoporose e diabetes mellitus (Quiñones et al., 2013; Dudarić et al., 2015; Zhou et al., 2016; Silveira et al., 2018). As doenças degenerativas como as anteriormente referidas estão associadas geralmente ao envelhecimento. Os danos oxidativos causados nos componentes celulares, DNA, proteínas e lípidos que se acumulam com a idade, contribuem para a degeneração das células somáticas e para a patogénese dessas mesmas doenças. As propriedades antioxidantes presentes nos polifenóis podem limitar esses danos ao atuarem diretamente nas espécies reativas de oxigénio ou ao estimular os sistemas de defesa endógenos (Scalbert et al., 2005a).

1.3.3. Antocianinas

As antocianinas têm vindo a suscitar um interesse crescente no que toca às suas aplicações, devido à sua ampla gama de cores e aos seus benefícios na saúde (Castañeda-Ovando et al., 2009). Estes compostos são o maior grupo de pigmentos fenólicos, e ocorrem frequentemente nas frutas, flores e folhas de plantas (He & Giusti, 2010; Silva et al., 2016; Solymosi et al., 2015). Apresentam uma vasta gama de cores como o vermelho, azul e roxo, sendo que o espectro de absorção das antocianinas varia entre 400-600 nm (Wahyuningsih et al., 2017).

Estes compostos são pigmentos solúveis em água, facilitando a sua incorporação em meios aquosos e tornando-os uma alternativa de interesse para serem utilizados como corantes naturais, uma vez que são inofensivos para o ser humano (Castañeda-Ovando et al., 2009).

Não é um composto químico único, uma vez que se trata de uma classe de compostos com mais de 600 antocianinas identificadas na natureza, 500 das quais presentes na alimentação humana (Krga & Milenkovic, 2019; Wrolstad & Culver, 2012). As antocianinas estão presentes na alimentação humana, maioritariamente com o consumo de frutos vermelhos e alguns vegetais onde estão presentes em diferentes concentrações (**Tabela 3**) (Bueno, Sáez-plaza, et al., 2012; Mateus & Freitas, 2008).

Tabela 3. Diferentes concentrações de antocianinas em diversas fontes vegetais (adaptado de Mateus & Freitas, 2008)

Fonte da Antocianina	Quantidade (mg/L ou mg/kg)
Amora	1150
Mirtilo	825-4200
Cereja	20-2500
Arando	600-2000
Sabugueiro	2000-10000
Uva vermelha	300-7500
Beringela	7500
Vinho do Porto	140-1100
Vinho Tinto	240-350

Neste contexto, apesar do grande potencial das aplicações que as antocianinas representam na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética, o seu uso/sua aplicação tem sido limitado devido à sua instabilidade que é afetada/influenciada por fatores químicos e físicos durante o processamento e armazenamento dos produtos alimentares (Cavalcanti et al., 2011).

1.3.3.1. Estrutura Química

As Antocianinas pertencem ao subgrupo dos flavonoides, no grande grupo dos compostos polifenólicos. A sua estrutura é constituída por dois anéis aromáticos (A e B) ligados por um anel heterocíclico (anel C) (**Figura 5**) (Bueno, Sáez-plaza, et al., 2012).

Esta estrutura base sofre alterações e é responsável pela grande diversidade de antocianinas. A mesma diversidade resulta de diferenças no número e na localização dos grupos Hidroxilo (OH) e o seu grau de metilação, a natureza, o número e a posição do açúcar ligado à aglicona e a natureza e o número de ácidos alifáticos e ácidos aromáticos ligados a esses açúcares (Tabela 3) (Wrolstad & Culver, 2012). Estes compostos são estabilizados através de modificações na forma aglicona (antocianidinas) por processos de glicosilação, metilação e acilação (Yonekura-Sakakibara et al., 2008).

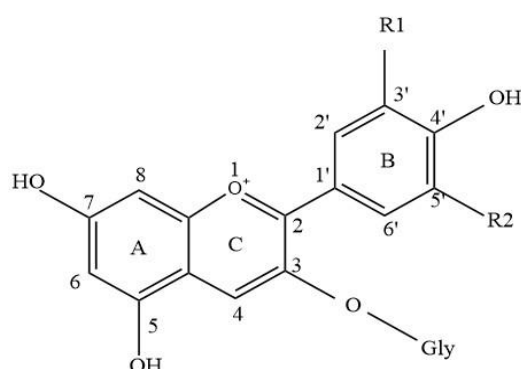


Figura 5. Estrutura generalizada das antocianinas, [R1 and R2 = H, OH, ou OMe; substituição glicosídica nos carbonos 3, 5 ou 7; possível acilação nos açúcares (adaptado de (Krga & Milenkovic, 2019; Wrolstad & Culver, 2012).

Tabela 4. Diferentes concentrações de antocianinas em diversas fontes vegetais (adaptado de Mateus & Freitas, 2008).

Antocianidina (aglicona)	Substituintes	Distribuição aproximada em frutas e vegetais	Cor	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)
Pelargonidina	R1=R2=H	~ 12%	Magenta	535
Cianidina	R1=OH, R2=H	~ 50%	Magenta	532
Delfinidina	R1=R2=OH	~ 12%	Vermelho	520
Peonidina	R1=OCH ₃ , R2=H	~ 12 %	Roxo	542
Petunidina	R1=H, R2=OCH ₃	~ 7%	Roxo	546
Malvidina	R1=R2=OCH ₃	~ 7%	Vermelho	543

1.3.3.2. Fatores que afetam a estabilidade das antocianinas

A única problemática associada ao uso de antocianinas como corantes alimentares é a sua baixa estabilidade. Na natureza, a cor que estes pigmentos exibem nas plantas depende de vários fatores tais como a estrutura e concentração, o pH, a temperatura e a presença de metais e outros compostos incolores que atuam como copigmentos (Malien-Aubert et al., 2001; Cavalcanti et al., 2011) .

1.3.3.2.1. pH

As antocianinas caracterizam-se por apresentarem uma grande suscetibilidade a mudanças de pH sendo mais estáveis em meios com baixos valores de pH do que em soluções com pH mais elevado onde são mais facilmente degradadas (Cavalcanti et al., 2011).

As antocianinas destacam-se de outros flavonoides uma vez que estas sofrem um rearranjo da sua estrutura em resposta ao pH da solução (Bueno, Sáez-plaza, et al., 2012). Esta reorganização da sua estrutura é responsável pelas suas diferentes tonalidades, sendo que a cor de uma solução contendo antocianinas também é determinada pela proporção das diferentes formas destes pigmentos, nomeadamente catião flavílio vermelho (AH^+), base quinoidal violeta (A), pseudobase, carbinol ou hemiacetal incolor (B) e chalconas de cor amarela (C) (Bueno et al., 2012).

A pH muito ácido ($pH < 2$) as antocianinas existem predominantemente sob a forma de catião flavílio (AH^+), com o aumento de pH o catião flavílio é sujeito a uma reação de transferência de prótons, dando origem a uma base quinoidal azul/roxa (A); simultaneamente, mas a um ritmo mais lento, o catião flavílio leva à formação de uma forma hemiacetal incolor (B) com a reação de hidratação. A espécie hemiacetal é depois sujeita a uma reação de tautomerização, dando origem a cis-chalcona amarelo pálido (Cc) que isomeriza em trans-chalcona (Ct) (**Figura 6**) (Cavalcanti et al., 2011; Sousa et al., 2014).

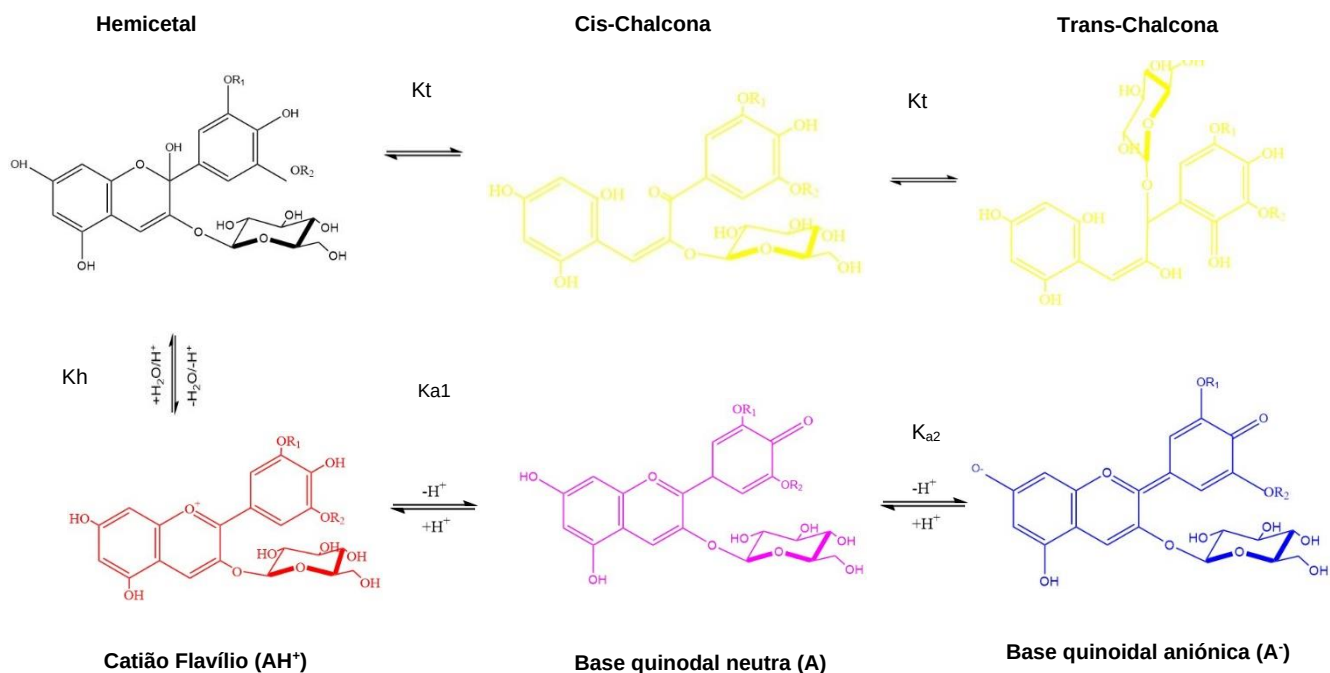


Figura 6. Principais espécies de equilíbrio das antocianinas: base quinoidal (QB), o catião flavílio (FC), pseudobase ou carbinol (FC) e chalcona (CH) (Adaptado de (Fernandes et al., 2014)).

1.3.3.2.2. Temperatura

A estabilidade das antocianinas e dos pigmentos encontrados nos produtos alimentares no geral diminui durante o processamento e armazenamento quando a temperatura aumenta (García-Viguera et al., 1998; Sui et al., 2014). Esta degradação térmica por parte das antocianinas também pode levar à formação de compostos de cor castanha que é agravada na presença de oxigénio e em situações em que a quantidade de água disponível é maior (Markakis, 1982; Tonon et al., 2010). Também a conjugação de valores elevados de pressão com valores elevados de temperatura, resulta numa aceleração da degradação das antocianinas (Buckow et al., 2010).

1.3.3.2.3. Outros fatores

Para além do pH e da temperatura também o solvente utilizado e a concentração da antocianina influenciam a estabilidade da solução. Uma maior concentração do composto resulta geralmente numa maior estabilidade e intensidade de cor das soluções (Cavalcanti et al., 2011). O aumento da estabilidade da solução com o aumento de concentração de antocianinas é explicado pelo fenómeno de auto-associação (Dao et al., 1998).

Estudos anteriores com xarope de morango, evidenciaram também que a concentração total de antocianinas é mais relevante no que toca a estabilidade do que as diferentes antocianinas em si (Skrede et al., 1992; Giusti & Wrolstad, 2003).

1.3.3.3. Mecanismos de estabilização das antocianinas

Existem atualmente diversos métodos para estabilizar antocianinas sendo que os mais utilizados são as reações de encapsulação e as de associação (Cavalcanti et al., 2011).

1.3.3.3.1. Técnicas de encapsulação

A encapsulação é uma técnica regularmente usada na indústria alimentar, principalmente na produção de alimentos funcionais. Consiste em revestir uma substância ativa com um material inerte. O material que é encapsulado é designado como núcleo, material ativo ou fase interna. O material usado para revestir este composto é designado como material de revestimento, membrana ou cápsula (Timilsena et al., 2020). Os agentes de encapsulação atuam como uma camada protetora contra condições ambientais adversas tais como a luz, a humidade e o oxigénio (Yousuf et al., 2016). Alguns estudos utilizaram polímeros naturais como agentes de encapsulação de antocianinas tais como goma arábica e pectinas (Cavalcanti et al., 2011).

Existem atualmente diferentes métodos de encapsulação aplicados em várias indústrias descritos por vários autores, no entanto apresentam algumas limitações uma vez que precisam de reunir diferentes fatores, como o grau de afinidade do composto bioativo e da sua camada de revestimento, o equipamento utilizado dependendo da técnica, entre outros, o que não torna o processo simples (McClements, 2015; Timilsena et al., 2020).

1.3.3.3.2. Reações de associação

A associação das antocianinas com outros compostos afeta não só a sua cor, mas também a sua estabilidade. Existem três tipos de reações de associação, as reações de auto-associação entre as antocianinas; reações de copigmentação que se dividem em copigmentação intramolecular com os grupos aromáticos dos ácidos hidrocínâmicos; e em copigmentação intermolecular com substâncias incolores como o flavonol; e as reações de associação com metais com os grupos OH livres das antocianinas (Cavalcanti et al., 2011).

1.3.3.3.2.1. Copigmentação

A copigmentação consiste num fenómeno espontâneo e exotérmico em que os pigmentos e outras substâncias orgânicas incolores, formam associações moleculares ou complexos, dando origem a uma mudança ou aumento da intensidade da cor (Boulton, 2001). Este fenómeno trata-se de uma reação que consiste no empilhamento de uma molécula orgânica (copigmento) na secção polar das formas com cor das antocianinas, nomeadamente o catião flavílio e as bases quinoidais. A copigmentação pode dividir-se em dois mecanismos, a copigmentação intramolecular e a copigmentação intermolecular que inclui a auto-associação, em ambos os casos os complexos adquirem a conformação “sandwich” (**Figura 7**) (Escribano-Bailon & Santos-Buelga, 2012).

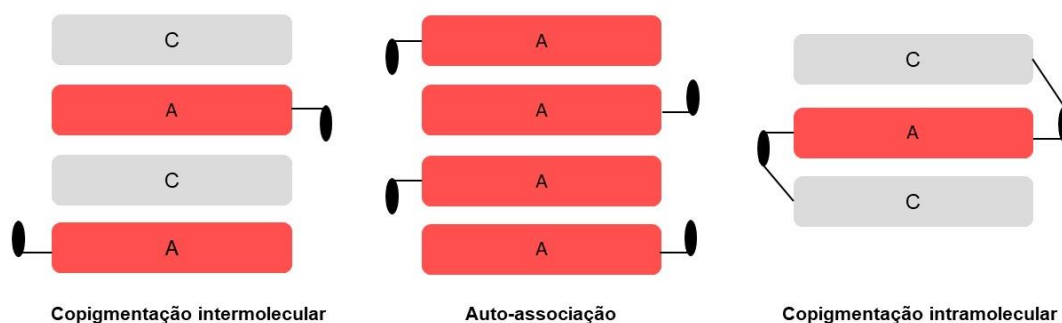


Figura 7. Configuração/Esquema/Conformação dos complexos nos diferentes tipos de copigmentação (A- antocianina; C- copigmento) (adaptado de (Escribano-Bailon & Santos-Buelga, 2012)).

O copigmento é uma molécula incolor ou parte dela, sendo um sistema rico em eletrões, capaz de se associar com o catião flavílio, que é pobre em eletrões (Escribano-Bailon & Santos-Buelga, 2012).

Esta técnica, para além de resultar em valores de absorvância maiores (aumento hiperocrómico), a adição de alguns co-fatores resulta num aumento batocrómico em que o comprimento de onda em que é registada uma absorvância máxima, aumenta 5 a 20 nm dando origem a uma tonalidade azul-roxa numa solução previamente vermelha (Boulton, 2001). A técnica de copigmentação das antocianinas, através da complexação com outras moléculas é uma alternativa relativamente simples para aumentar a estabilidade das antocianinas em solução face a outras técnicas existentes (Jurić et al., 2020).

1.3.3.3.2.1.2. Complexação metálica

As tonalidades azuis das antocianinas ocorrem na natureza devido a uma mudança de cor dependente do pH e devido aos fenómenos de interação com metais bi e trivalentes (Buchweitz et al., 2012a; Sigurdson et al., 2017). É possível observar esta interação na mudança de cor das hidrângeas (*Hydrangea macrophylla*) de vermelho para azul dependendo da quantidade de alumínio do solo (Buchweitz, et al., 2012a). Os metais mais comuns encontrados nestes mesmos complexos com antocianinas

são o estanho (Sn), cobre (Cu), Ferro (Fe), alumínio (Al), magnésio (Mg) e o potássio (K) no entanto o grau de oxidação dos iões de ferro desempenham um papel fundamental na formação de complexos no fenómeno de copigmentação (Cavalcanti et al., 2011; Markakis, 1982).

A formação deste complexo antocianina-metal requer a presença de pelo menos dois grupos hidroxilo livres no anel Benzeno nas antocianinas para que o metal possa complexar, como se verifica no caso da Cianidina, Delfinidina e Petunidina. O facto destes complexos metálicos serem formados a valores de pH entre 4 e 6, torna-os candidatos alternativos aos corantes sintéticos alimentares, uma vez que a maior parte dos alimentos apresenta valores de pH dentro desse intervalo (Buchweitz, et al., 2012a) (**Figura 8**).

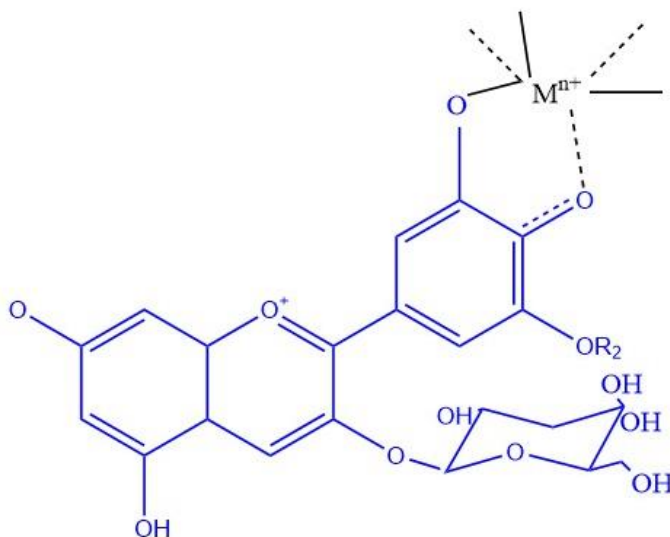


Figura 8. Estrutura generalizada do complexo antocianina-metal (Adaptado de (Yoshida et al., 2009)).

Os complexos antocianina-metal são estabilizados por copigmentação intramolecucular por acilação deslocando o equilíbrio de hidratação da antocianina. Os iões metálicos induzem a deprotonação do anel benzeno da antocianina, transformando o catião flavílio para a espécie base quinoidal azul a valores de pH mais baixos (Buchweitz et al., 2013).

1.4. Compostos não Polifenólicos

Comparativamente aos corantes vermelhos, os de cor verde e azul são muito pouco utilizados na indústria alimentar. A reduzida utilização destas cores está relacionada com obstáculos no que toca a legislação e regulamentação alimentar (Galaffu et al., 2015). Simultaneamente, existem muito poucas alternativas de corantes azuis naturais que estão disponíveis para comercialização, estes são extraídos por exemplo de cianobactérias (*Spirulina spp.*), de gardénias azuis (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) ou da flor da ervilha azul (*Clitoria ternatea* L.) (Buchweitz, et al., 2012a).

1.4.1. *Chrozophora tinctoria*

O género *Chrozophora* pertence à família Euphorbiaceae que engloba sete a oito espécies monóicas herbáceas. Este género de plantas está distribuído no Paquistão, Índia, África Ocidental e regiões do Mediterrâneo (Abdallah et al., 2015).

Algumas das espécies pertencentes a este género são muito usadas em medicina tradicional no tratamento de várias doenças. O género *Chrozophora* é caracterizado por possuir diferentes propriedades biológicas, antioxidantes, antimicrobianas e anticancerígenas (Golkar et al., 2019).

Destacando a *Chrozophora Tinctoria* A. Juss, também designada como “turnsole”, é uma planta pertencente ao género anteriormente referido e é uma planta herbácea monóica, em que os órgãos reprodutores femininos e masculinos encontram-se em diferentes flores na mesma planta (Başlar, 2000). É uma planta anual, a sua floração ocorre entre os meses de Maio e Setembro e a maturação dos seus frutos ocorre entre Julho e Outubro. Os seus frutos maduros possuem uma tonalidade azul-escura com cápsulas ligeiramente lobadas que são revestidas por escamas com dimensões entre 5 e 8 nm de diâmetro (**Figura 9**) (Nabais et al., 2020) .



Figura 9. Fotografia dos frutos de *C. Tinctoria* (adaptado de (Nabais et al., 2020a))

Esta espécie é nativa de vários países em África (Argélia, Egito, Líbia, Marrocos, Tunísia e Iémen); Ásia (Kuwait, Arábia Saudita, Afeganistão, Irão, Iraque, Israel, Jordânia, Líbano, Síria, Turquia, Cazaquistão, Turquemenistão, Índia e Paquistão) e Europa (Ucrânia, Albânia, Bulgária, Grécia, Itália, Malta, França, antiga Jugoslávia, Portugal e Espanha) (Delazar et al., 2006).

1.4.1.1. Aplicações na Época Medieval

O uso da tinta obtida a partir desta planta remonta para a antiguidade. As soluções azul arroxeadas extraídas da *C. tinctoria* eram armazenadas em pedaços de tecido onde eram impregnadas e posteriormente secas, e eram usadas como aguarelas, colocando o tecido tingido no meio apropriado (Nabais et al., 2020). O pigmento proveniente da planta era essencialmente utilizado no século XXVII, em manuscritos medievais, tendo a sua utilização caído em desuso no século XIX (Maurya, 2018; Nabais et al., 2020).

Estes corantes obtidos das flores, fruta e da seiva eram comestíveis, deste modo eram aplicados em produtos alimentares. Eram usados para conferir uma coloração extra a hipocra, uma bebida semelhante ao vinho, mas com especiarias como a canela. Eram usados também para tingir geleias, vinhos, certos licores e outros produtos tais como queijo holandês, mais precisamente o seu revestimento (Maurya, 2018).

1.4.1.2. Propriedades Medicinais

Esta planta está documentada como tendo diversas propriedades medicinais, nomeadamente propriedades catárticas sendo utilizada como laxante; propriedades eméticas sendo utilizada para provocar o vômito; propriedades anti-inflamatórias derivadas da atividade anti-inflamatória dos polifenóis, presentes na composição da *C. tinctoria*. Também é utilizada no tratamento de febre, provocando a diminuição da temperatura corporal e no tratamento e controlo de verrugas (Abdallah et al., 2015; Maurya, 2018).

1.4.1.3. Composição

A *C. tinctoria* é conhecida pela sua capacidade de produzir substâncias que são utilizadas como tinta, e por ser rica em flavonoides apesar de não serem estes os compostos responsáveis pela cor característica do extrato. Simultaneamente às antocianinas foram identificados outros compostos noutras espécies do género *Chrozophora*, tais como xantonas e cumarinas entre outros (Delazar et al., 2006).

Estudos anteriores com *C. tinctoria* revelaram que o extrato desta planta evidenciou um pico nos 266 *m/z* no espectro de massa, apesar de não ter sido identificado a estrutura responsável pela tinta azul (Aceto et al., 2015). As antocianinas foram também propostas como sendo o composto responsável pela cor azul da tinta obtida, no entanto a comparação do espectro do visível e ultravioleta (UV) e do espectro de massa do extrato da planta e das antocianinas mais comuns não evidenciaram nenhuma semelhança (Wallert, 1990).

Estudos mais recentes procuraram estudar e caracterizar o extrato desta planta onde foi descoberto o composto responsável pela cor azul e a estrutura molecular do mesmo, a chrozoforidina (Figura 10). Neste estudo foram também descobertos outros cromóforos, no entanto em menores quantidades com a técnica de HPLC-HRMS-DAD (Nabais et al., 2020). Com esta análise o extrato purificado evidenciou a presença de um pico de absorvância máxima nos 540 nm correspondendo a uma cor azul arroxeadada. Adicionalmente nesta análise também foram identificadas algumas antocianinas no extrato do fruto, mas em quantidades muito menores. Nesta análise,

as antocianinas foram identificadas através do espectro de massa e o tempo de retenção cromatográfico foi comparado com padrões. Com base na sua massa exata (501.1371), a composição elementar foi proposta como sendo $C_{20}H_{24}O_{13}N_2$ (500.41 g mol⁻¹). Neste estudo, foram observados vários picos, mas nenhum correspondente a 266 *m/z* como Aceto et al. (2015) relatou no seu trabalho. Ainda na análise do composto em questão, as análises por EPR comprovaram a ausência de espécies radiculares em solução.

Os resultados do estudo realizado por Nabais et al. (2020) revelaram que a estrutura química do composto azul correspondia a 6'-hidroxi-4,4'-dimetoxi-1,1'-dimetil-5'--[[3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil) tetrahydro-2H-piran-2-il]oxi][3,3'-bipiridina]-2,2',5,6(1H,1H')-tetraona, que se trata de um derivado de hermidina designado de chrozoforidina (Figura 10).

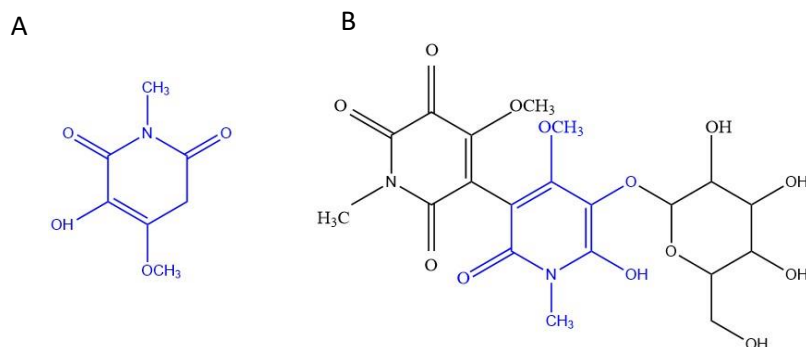


Figura 10. Estrutura da hermidina (A) e do seu derivado, a chrozoforidina (B) - composto responsável pela cor azul da tinta obtida da *Chrozophora tinctoria* (Adaptado de (Nabais et al., 2020a)).

Objetivos

Dada a posição mais ativa do consumidor no desenvolvimento de novos produtos alimentares e a falta de alternativas naturais para corantes alimentares azuis, o presente trabalho procurou explorar as diferentes propriedades de diferentes compostos para possíveis futuros corantes.

Assim, estudou-se o comportamento de complexos antocianina-metal sujeitos a diferentes condições de processamento alimentar de forma a analisar a estabilidade de cor dos mesmos e as eventuais propriedades que poderiam conferir aos produtos alimentares onde estivessem inseridos. Foi também analisada a capacidade de formação de complexos metal-extrato bruto devido ao interesse económico em utilizar extratos em que não seja necessária a sua purificação. À semelhança dos complexos metálicos, surgiu também outra alternativa com cor azul, a *Chrozophora tinctoria* com diversas propriedades em matrizes alimentares documentadas, porém muito pouco estudadas. Desta forma, procurou-se também fazer ensaios preliminares com o extrato do fruto das plantas, de forma a perceber se havia interesse em incorporar o mesmo em alimentos futuramente.

II. Materiais e métodos

2.1. Reagentes

O acetonitrilo (ACN), o metanol (MeOH), o ácido fórmico e o ácido cítrico foram adquiridos Da Chem-Lab (EUA). O hidróxido de sódio (NaOH) foi adquirido da LabChem (Portugal). O reagente de Folin Ciocalteu, foi obtido da Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha). O dimetilsulfóxico (DMSO) da Honeywell Biedel-de-Haen™ (Portugal). O acetato de sódio NaO_2CCH_3 , o cloreto de ferro (III) (FeCl_3), o citrato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$), o acetilacetato de zinco ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{Zn}$), o Brometo de Cobre (CuBr_2), o sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), o sulfato de Magnésio (MgSO_4) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). O cloreto de alumínio (AlCl_3), o ácido bórico (H_3BO_3), o alúmen de potássio $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e o ácido fosfórico (H_3PO_4) adquirido da Merck (Alemanha), a goma arábica da Acros organics (Portugal). O ácido clorídrico (HCl) foi adquirido da Honeywell Biedel-de-Haen™ (Portugal). O óxido de zinco (ZnO) da Griffin & George Ltd (Inglaterra).

Para os ensaios antimicrobianos, a peptona e o extrato de levedura foram adquiridos da VWR Chemicals (EUA), o agar da Chem-Lab (EUA), o sulfato de streptomicina e a ampicilina (sal de sódiod) da PanReac AppliChem (EUA).

2.2. Preparação do extrato

2.2.1. Obtenção do Extrato Antociânico

A amora preta é uma fruta pequena com coloração púrpura devido ao elevado teor de antocianinas. É conhecida por possuir elevados teores de cianidina-3-glucose e cianidina-3-rutinese e em menores quantidades cianidina-3-sambubiose e cianidina-3-xilosilrutinosidose (Bowen-Forbes et al., 2010).

As antocianinas foram primeiramente extraídas de amoras pretas congeladas (~ 1kg) com recurso a uma solução de 2L de MeOH : H_2O (1:1 v/v) acidificada com HCl 0.1M. A extração foi feita sob agitação (DLAB MS7-H550-S) durante 1 hora à temperatura

ambiente. Posteriormente, uma segunda extração foi feita novamente com a preparação de uma solução de 2L de MeOH : H₂O (1:1 v/v) acidificados com HCl a 0.1M colocada em agitação à temperatura ambiente durante 23 horas. Após a extração, a solução de metanol contendo as antocianinas foi separada da fração sólida por centrifugação.

A purificação da solução previamente extraída, foi realizada por cromatografia de fase reversa com gel de sílica C18, com recurso a um funil de Buchner (porosidade G3) e a um sistema de vácuo. O extrato centrifugado foi colocado por cima do gel, e posteriormente foi lavado várias vezes com água desionizada previamente acidificada de forma a retirar os açúcares simples e outras impurezas do extrato. Seguidamente, foram obtidas várias frações utilizando soluções com diferentes concentrações de metanol), nomeadamente 10% e 20% e, no final, 100% para lavagem do gel C18. Depois procedeu-se à evaporação do metanol com um evaporador rotativo a vácuo.

A composição de cada fração foi analisada utilizando um HPLC-DAD (Merck-Hitachi Elite Lachrom; forno L-2300; Detetor DAD L-2455; Auro sampler L-2200; bomba L2130). Assim, foram injetados 20 µL de cada amostra numa coluna Merck de fase reversa C18 ODS (dimensões da coluna: 250 x 4,6 mm, 5µm, d.i.) e os solventes utilizados foram A: HCOOH/H₂O (10:90 v/v) e B: HCOOH:ACN:H₂O (10:30:60 v/v/v). Todos os cromatogramas foram obtidos a um comprimento de onda de 520nm, 23°C (temperatura do forno), um fluxo de 1,0 mL/min e seguindo o gradiente de eluição descrito na **Tabela 5** (Cruz et al., 2015) (Cruz et al., 2015).

Os cromatogramas de cada amostra foram obtidos a dois comprimentos de onda, 520 e 280 nm. O extrato foi posteriormente congelado e liofilizado.

Tabela 5. Gradiente de eluição dos diferentes solventes na análise por HPLC de antocianinas

Tempo (min)	Solv. A (%)	Solv. B (%)
0	80	20
70	15	85
75	0	100
85	0	100
90	80	20

2.2.2 Caracterização dos extratos antociânicos

2.2.2.1. Quantificação do conteúdo total de fenóis

A quantidade de polifenóis total de cada fração previamente extraída e purificada, foi determinada usando o método Folin-Ciocalteu ajustado à microescala (Sánchez-Rangel et al., 2013). 1 mg de cada extrato foi ressuspenso em 1 mL de MeOH. Num microtubo, foram colocados 15 µL de cada amostra, 75 µL de reagente Folin-Ciocalteu e 500 µL de H₂O destilada, sendo posteriormente agitado num vortex. Seguidamente, foram adicionados 300 µL de Na₂CO₃ 20% e 610 µL de H₂O destilada e a solução foi novamente agitada. 30 minutos após a preparação das soluções, a absorvância de 350 µL de cada solução foi registada a 750 nm.

Foi necessário ajustar o percurso ótico (yy/cm) consoante o volume final utilizado (xx/µL), segundo a **Equação 1**. A concentração fenólica total foi calculada através de uma reta de calibração utilizando o ácido gálico como padrão (**Equação 2**) presente na **Tabela 6**.

Tabela 6. Equações usadas na determinação do teor de fenóis totais utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu

Equação 1.	$yy = 0,0027xx$
Equação 2.	$y = 0,8949x + 0,0121$

O resultado apresentado representa o valor médio dos triplicados de cada amostra, em mg/mL equivalentes de ácido gálico, e o desvio padrão associado.

2.2.2.2. Quantificação de cianidina-3-glucósido nas diferentes frações extraídas

A quantificação de cianidina-3-glucósido nas diferentes frações do extrato foi feita por HPLC-DAD de acordo com a literatura ((Cruz et al., 2015)). A análise foi feita utilizando um HPLC Elite Lachrom utilizando o método descrito anteriormente.

2.3. Preparação das soluções tampão

Para a preparação dos complexos antocianina-metal foram testados três tampões diferentes de forma a concluir qual apresentava um melhor desempenho. Primeiramente foi preparada uma solução de Tampão Universal e mais tarde foi utilizado um tampão frequentemente usado na indústria Alimentar, o Tampão Acetato (**Tabela 7** e **Tabela 8**).

Tabela 7. Constituintes do tampão universal usados nos ensaios preliminares. (Para 100 mL) (Adaptado de base de dados Sigma-Aldrich).

Reagente	Tampão Universal
H ₃ PO ₄ 85%	0,225 mL
C ₆ H ₈ O ₇ *H ₂ O	0,7 g
H ₃ BO ₃	0,345 g
NaOH 1M	34,4 mL
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	-
CH ₃ COOH	-
C ₂ H ₃ NaO ₂	-
H ₂ O desionizada	65,375 mL

Tabela 8. Constituintes do tampão Acetato 0,2 M usado em todos os ensaios (Adaptado de base de dados Sigma-Aldrich).

pH	x mL de Acetato de sódio 0,2M	y mL de Ácido Acético
3,7	1,0	9,0
4	1,8	8,2
4,6	4,9	5,1
5,2	7,9	2,1
5,6	9,1	0,9

2.4. Síntese dos Complexos Antocianina-Metal

De forma a obter complexos com novas cores a partir da cianidina-3-glucósido e estabilizar a antocianina na tentativa de formular um eventual futuro corante alimentar foram sintetizados vários quelatos metal-antocianina. O solvente maioritariamente usado foi o tampão acetato, e para ensaios preliminares o Tampão Universal. O pH do tampão acetato foi acertado para os valores 3,7, 4, 4,6, 5,2 e 5,6 com recurso a HCl 0,1M e NaOH 0,1 M.

Foi preparada uma solução stock de um extrato rico em cianidina-3-glucósido a uma concentração de 0,98 mg/mL (1×10^{-5} M) ressuspendida em HCl 0,1 M. As proporções de metal-antocianina foram adaptadas de literatura anterior: foi preparada uma proporção antocianina:metal de 1:1 em todos os metais testados (CuSO_4 , AlCl_3 , $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{Zn}$, CuBr_2 , ZnO , $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e FeCl_3) exceto nos ensaios com AlCl_3 em que a proporção foi de 1:2 (Buchweitz, et al., 2012a).

Após serem selecionados os metais com melhor desempenho de complexação com a cianidina, foram preparadas soluções de 700 μL em microtubos. Cada solução incluindo os brancos, foi preparada aos valores de pH previamente selecionados e agitada num vortex durante 1 minuto. Para cada ensaio os metais foram ressuspendidos em tampão acetato com diferentes valores de pH.

2.5. Adição de Goma Arábica nos complexos

Após a formação dos complexos, foi analisada a adição de um composto que evitasse a precipitação desses complexos (**Tabela 9**). Para isso, o procedimento foi adaptado usando literatura anterior, tendo sido adicionada Goma Arábica, uma resina natural composta por polissacarídeos e glicoproteínas. A mesma foi ressuspendida em tampão aos pHs anteriormente referidos e posteriormente adicionada aos complexos na mesma quantidade de tampão anterior. Nos complexos foram analisadas 3 percentagens diferentes de goma arábica, 0,2%, 0,7% e 1%.

Tabela 9. Síntese dos complexos utilizados nos diferentes ensaios. Adaptado de (Buchweitz, et al., 2012a).

Reagente	Complexos de Ferro	Complexos de Alumínio
Tampão Acetato 0,2 M	583,8 µL	571,2 µL
Solução Cianidina stock (0,98 mg/mL)	51,8 µL	51,8 µL
NaOH (0,1M)	51,8 µL	51,8 µL
FeCl₃ (1,36 mg/mL)	12,6 µL	-
AlCl₃ (1,12 mg/mL)	-	25,2 µL

2.6. Estudo da estabilidade da cor dos complexos

Após a formação dos complexos, de forma a estudar a estabilidade da cor dos mesmos, foi traçado o espectro de absorção entre 360 e 830 nm utilizando o leitor de placas de 96 poços *Bio-tek instruments*. para cada ensaio à temperatura ambiente (20°C). Os espectros foram traçados para os complexos com e sem goma arábica 0h e 24h após a síntese dos mesmos.

2.6.1. Liofilização e posterior ressuspensão dos complexos

Com o objetivo de tentar criar uma formulação química que permitisse conservar os complexos até à sua utilização, tentou-se obter um pó. Para isso, os complexos formados com o extrato rico em cianidina-3-glucósido foram liofilizados para uma futura aplicação dos mesmos.

Para analisar a manutenção/consistência da cor dos complexos metálico-antociânicos, os complexos com goma arábica foram sintetizados em tampão acetato aos pHs previamente utilizados, foram congelados e posteriormente liofilizados. Após a liofilização, foram ressuspensos em água e foi traçado o espectro de absorção de cada amostra e registado o valor de pH dos mesmos antes e depois de liofilizados.

2.6.2. Degradação Térmica

Sendo que a temperatura constitui um dos fatores limitativos para o uso de corantes naturais em matrizes alimentares, foram também realizados ensaios de degradação térmica. Para estes ensaios, os complexos foram submetidos a diferentes temperaturas: 20°C, 40°C, 60°C, 80°C e 100°C; durante 30 minutos num termobloco (Thermo Scientific), e posteriormente foi traçado o espectro de absorção para ser analisada a variação da sua cor.

2.6.3. Cinéticas

De forma a analisar a variação do espectro de absorção dos complexos com o tempo, foram realizadas cinéticas para cada ensaio com o intervalo de 10 minutos ou de 60 minutos, dependendo do ensaio entre a obtenção de cada espectro de absorção entre 186 e 1106 nm à temperatura ambiente (20°C).

2.6.4. Extrato Bruto

Foram também realizados ensaios com extrato bruto proveniente da extração das amoras, no sentido de perceber se seria possível a complexação dos metais previamente utilizados e qual seria a intensidade da cor dos mesmos caso a complexação se verificasse. Foram usadas concentrações de 1 mg/mL e 3 mg/mL de extrato bruto enquanto as concentrações dos restantes constituintes dos complexos permaneceram inalteradas. Os resultados obtidos foram comparados com os obtidos com o extrato rico em cianidina-3-glucósido.

2.7. Cálculo das coordenadas de cor do CIE $L^*a^*b^*$

As coordenadas de cor para diferentes amostras, observadores e iluminações podem ser obtidas através de espectrocolorímetros. Os mesmos medem a transmitância

espectral e posteriormente usam procedimentos CIE padronizados. Uma vez que as transmitâncias espectrais obtidas nos diferentes ensaios não foram dados provenientes de uma medição, foram feitos os cálculos de cor exatamente da mesma forma que um espectro colorímetro faz internamente.

Para determinar as coordenadas do espaço CIE $L^*a^*b^*$ (método CIE (Weatherall & Coombs, 1992)) (**Figura 11**) foram determinados os espectros de transmitância para cada ensaio. De seguida as coordenadas L^* , a^* e b^* foram determinadas para cada ensaio utilizando um software desenvolvido pelo departamento de Física da Universidade do Porto. Foi utilizada uma condição iluminante D65 e com um ângulo do observador standard de de 10° para o espectro do visível da luz (360-830 nm). As leituras foram efetuadas num leitor de placas de 96 poços (*PoweWave Xs*, *Biotek*).

Nas situações pertinentes de determinar a Diferença Total de Cor (DTC), a mesma foi calculada segundo a metodologia de segundo a equação 1:

$$(1) TCD = \sqrt{(L_0 - L)^2 + (a_0 - a)^2 + (b_0 - b)^2}$$

Onde:

- L_0 , a_0 e b_0 : cores iniciais, sem tratamento

- L , a e b : determinado tempo, temperatura ou amostra comparativa

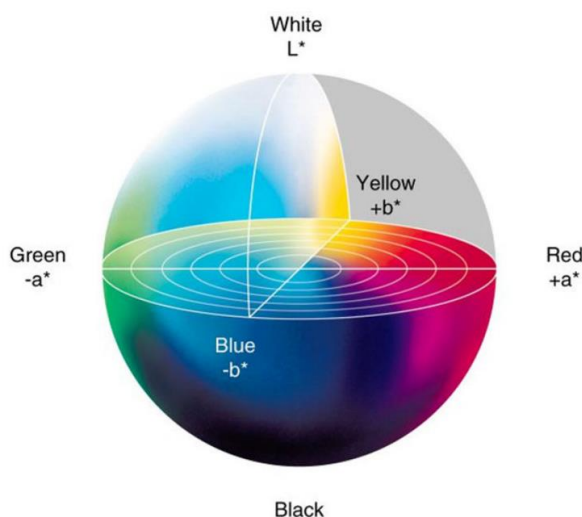


Figura 11. Estrutura de cor CIELAB. Adaptado de (Cortez et al., 2017).

2.8. Ensaios Antimicrobianos

2.8.1. Preparação dos Complexos para os Ensaios

Numa segunda parte deste trabalho procurou-se analisar e verificar os as possíveis características dos complexos conferidas à matriz alimentar. Para isso com o objetivo de estudar a atividade antimicrobiana dos mesmos realizaram-se ensaios previamente padronizados e estabelecidos pelo laboratório de Ecofisiologia Microbiana da Universidade do Porto.

Os complexos metálicos foram sintetizados em tampão acetato e posteriormente liofilizados de modo a conseguir pesar os mesmos.

Os complexos foram ressuspensos em DMSO a 100%. Posteriormente foi feita uma diluição com água estéril até obter uma solução stock com uma concentração de 10 mg/mL (de complexos) e garantir uma concentração máxima de 20% de DMSO em cada poço.

As condições nos poços nas placas de 96 poços, consistiram em duas concentrações diferentes de cada complexo metálico: 10 mg/mL e 1 mg/mL; e foram preparados os respetivos brancos (10 µL de cada concentração e 90 µL de água estéril para cada complexo e os diferentes controlos que irão ser abordados mais à frente.

2.8.1.1 Ensaios de Atividade Antimicrobiana

24 h após a cultura em meio sólido foi feito um pré inóculo de cada bactéria no mesmo meio líquido. Para os ensaios antimicrobianos, foram incubados 10 mL do pré-inóculo a 37°C com agitação de 250 rpm durante a noite. No dia seguinte várias condições/tratamento foram testadas numa placa de 96 poços com base em curvas de crescimento pré-determinadas, a OD_{600nm} foi obtida. Foram aplicadas as seguintes equações para padronização das culturas de *E.coli* (1) e *S.aureus* (2) para obter uma concentração final de 5×10^5 células:

$$(1) \ x = 4 \times 10^9 \times OD_{600nm} - 5 \times 10^7$$

$$(2) \ x = 5 \times 10^9 \times OD_{600nm} - 2 \times 10^7$$

As condições/tratamento utilizados nos poços foram: 90 µL das estirpes/bactérias target com 10 µL de ampicilina (40 mg/mL) ou streptomicina (10 mg/mL) para *S. aureus* e *E.coli* respetivamente como controlo positivo; 90 µL de culturas target e 10 µL de extrato (*Chrozophora tinctoria*) a uma concentração de 10 mg/mL e de 1 mg/mL; 90 µL de cultura e 10 µL de DMSO; 90 µL de cultura e 10 µL de meio NA como controlo (negativo) e 10 µL de cada solução complexo contendo diferentes concentrações e 90 µL de água estéril como brancos.

Posteriormente, a OD_{600nm} foi lida e a placa foi incubada a 37°C durante 24h tendo sido lida novamente após este período. O crescimento das culturas em cada poço foi calculado através da seguinte fórmula:

$$Crescimento \% = 100 \times \frac{(T_{fE} - T_{0E}) - (T_{fB} - T_{0B})}{(T_{fC} - T_{0C}) - (T_{fB} - T_{0B})}$$

Em que T_f representa a OD_{600nm} final e T_0 representa a OD_{600nm} inicial. B representa os brancos (extrato a diferentes concentrações e meio de cultura), C o crescimento controlo e E o tratamento a ser analisado.

Para cada ensaio foram feitas duas réplicas seguindo as mesmas condições, em triplicados para cada concentração de extrato e para cada bactéria em estudo.

2.8.2. Material Biológico e condições das culturas

Para o estudo de atividade antimicrobiana da *Chrozophora tinctoria*, foi utilizada uma estirpe de duas bactérias diferentes associadas a infeções alimentares, *E. coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (**Figura 12**). O material biológico utilizado nos mesmos ensaios foi obtido a partir da coleção microbiológica do Laboratório de Ecofisiologia Microbiana da Universidade do Porto (LEMUP).

A cultura do material biológico foi feita em meio NA (nutrient agar) (**Tabela 10**) e incubados a 37 °C na ausência de luz.

Tabela 10.Constituintes do meio de cultura Nutrient Agar sólido para 1000 mL de meio.

Reagentes	NA
Peptona	5 g
Extrato de Levedura	3 g
Agar	16 g
H ₂ O Desionizada	1000 mL

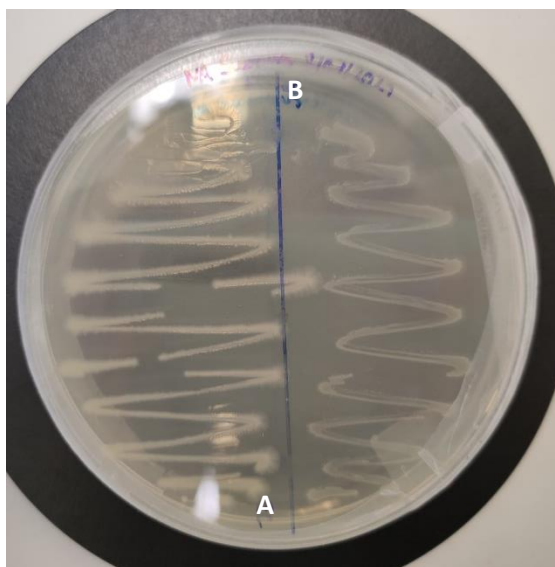


Figura 12. Culturas das estirpes utilizadas como material biológico nos ensaios antimicrobianos. (A) *E. coli* ATCC 25922; (B) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

2.8.3 Obtenção do Extrato de *Chrozophora tinctoria*

Numa segunda parte deste trabalho procurou-se analisar e estudar a atividade antimicrobiana de outra possível fonte de corantes azuis ainda pouco explorada. A alternativa selecionada foi a planta medieval *Chrozophora tinctoria* devido à

documentada potencial atividade microbiana a que está associada e devido à sua coloração apelativa. Os frutos da planta em estudo foram colhidos em Julho 2020 na região de Granja/Mourão no Alentejo. A extração foi feita a partir dos frutos frescos (~160 g) com recurso a 4 litros de MeOH:H₂O (70:30 v/v) durante 2 horas sob agitação originando uma solução de cor azul intensa. Seguidamente o metanol da solução foi evaporado com recurso a um evaporador rotativo a vácuo e o extrato azul foi analisado por HPLC-DAD (Hitachi Chromaster) e LC-MS (Finnigan LCQ DECA XP MAX) equipado com uma coluna C18 de fase-reversa (LicroCART ®) dimensões da coluna: 250 x 4,6 mm, 5µm, d.i.) e os solventes utilizados foram A: HCOOH/H₂O (1:99 v/v) e B: HCOOH:CH₃CN:H₂O (1:30:69 v/v/v). Posteriormente o extrato foi congelado e liofilizado.

A purificação da chrozoforidina foi realizada utilizando um cartucho C18 (Waters) com água desionizada, sob vácuo. Depois de recolhida a fração azul correspondente à chrozoforidina, foi congelada e liofilizada.

O extrato de *Chrozophora tinctoria* e a chrozoforidina foram ressuspensos em DMSO a 100% e diluídos até uma concentração máxima de 20% em cada poço.

III. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização dos extratos antociânicos

3.1.1. Massa obtida para cada extrato

As diferentes frações foram obtidas a partir de aproximadamente 1 kg de amora-preta. A massa obtida de cada fração liofilizada é possível observar na **Tabela 11**.

Tabela 11. Massa (em mg) de cada fração obtida

1ª Extração	Massa (mg)	2ª Extração	Massa (mg)
Extrato Bruto	177,05	Extrato Bruto	218,24
10% MeOH	365,41	10% MeOH	652,76
20% MeOH	97,19	20% MeOH	282,3

3.1.2. Quantificação do conteúdo total de fenóis

A quantificação de compostos fenólicos totais (CFT) foi obtida por espectrofotometria UV/Vis de acordo com o método de Folin-Ciocalteu, que se baseia na interação de substâncias redutoras (compostos fenólicos) com o reagente de Folin-Ciocalteu (Sánchez-Rangel et al., 2013).

Tabela 12. Concentração de compostos fenólicos totais nas diferentes frações previamente separadas após extração.

	1ª Ext. Ext. Bruto	1ª Ext 10% MeOH	1ª Ext 20% MeOH	2ª Ext. Ext. Bruto	2ª Ext. 10% MeOH	2ª Ext. 20% MeOH
Concentração em mg/mL	0,057± 0,001	0,697± 0,005	0,335± 0,002	0,137± 0,006	1,05± 0,03	0,387± 0,001
equivalentes de ácido gálico						

A partir dos dados da **Tabela 12**, é possível concluir que a fração com 10 % de MeOH é a que possui maior concentração de CFT, seguindo-se da fração de 20 % de MeOH e do extrato bruto em ambas as extrações.

Os resultados obtidos com o ensaio Folin-Ciocalteu evidenciaram uma maior quantidade de polifenóis totais nas frações obtidas na segunda extração relativamente à primeira. Os resultados estão de acordo com o esperado uma vez que primeira extração decorreu durante 1 hora sob agitação e a segunda durante 24h. A quantidade de polifenóis totais foi maior quando aumentado o tempo de extração, e o tempo de contacto com os solventes de extração (Mussatto et al., 2011; Xu et al., 2015).

No que toca aos resultados de CFT entre os extratos com diferentes percentagens de MeOH estão de acordo com o esperado, uma vez que no extrato bruto existe uma maior quantidade de outros compostos não fenólicos, tais como açúcares e proteínas o que poderá explicar a menor concentração de polifenóis nas frações tanto na 1^a como 2^a extração. Com uma primeira purificação com 10 % de metanol a maioria da cianidina-3-glucósido, que é a antocianina em maior concentração no material biológico usado, foi isolada (Guimarães et al., 2018). Enquanto na segunda purificação com 20 % de metanol foram separadas outras antocianinas que existem na amora, juntamente com a cianidina-3-glucósido que não foi separada, no entanto em menor concentração, o que explica a diferença de concentração de polifenóis entre as duas percentagens diferentes de MeOH.

3.1.2.1. Quantificação de cianidina-3-glucósido nas diferentes frações extraídas

Com a utilização de um padrão comercial de cianidina-3-glucósido, é possível obter o cromatograma desse composto. Tendo conhecimento do tempo de retenção da corrida cromatográfica em que é possível detetar a cianidina-3-glucósido, foi possível realizar a sua quantificação, por HPLC-DAD.

Com esta análise, constatou-se a presença de outros compostos em quantidades muito menores. Por isso, foram analisadas as áreas de todos os picos detetados, de forma a analisar a percentagem e a concentração de cianidina-3-glucósido em cada fração.

Para a quantificação de cianidina-3-glucósido presente nos diferentes extratos, foi utilizada uma reta de calibração obtida utilizando 1 mg de cianidina-3-glucósido comercial e sucessivas diluições. As amostras foram injetadas no HPLC-DAD e foi traçada a reta de calibração representada na figura seguinte (**Figura 13**):

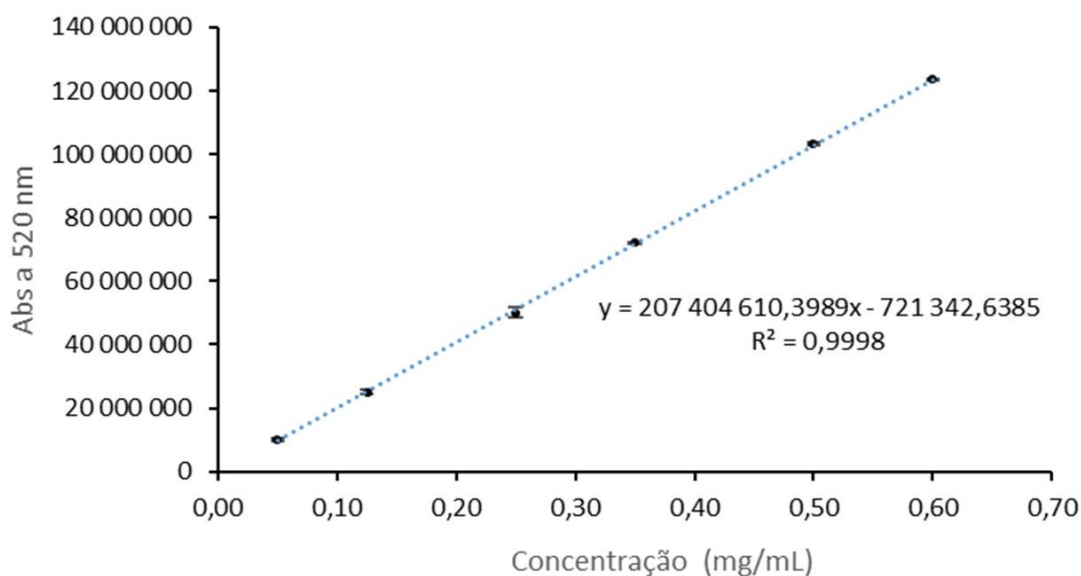


Figura 13. Reta de calibração obtida para a Cianidina-3-glucósido por HPLC-DAD.

Os cromatogramas referentes às frações de 10% e 20% de MeOH apresentam essencialmente o mesmo perfil (**Figura 15**), apresentando os mesmos picos (apenas

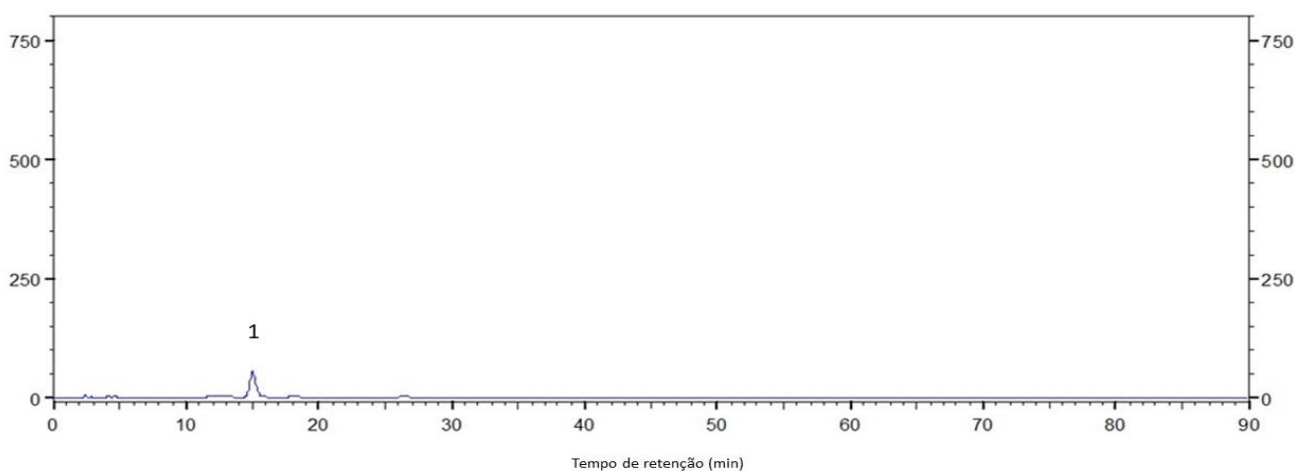


Figura 14. Cromatograma obtido por análise HPLC-DAD para o Extrato Bruto utilizado (Extrato Bruto 2ª Extração).

diferindo no valor da respetiva área), enquanto o cromatograma referente aos extratos brutos foi o que diferiu mais no que toca ao seu perfil (**Figura 14**).

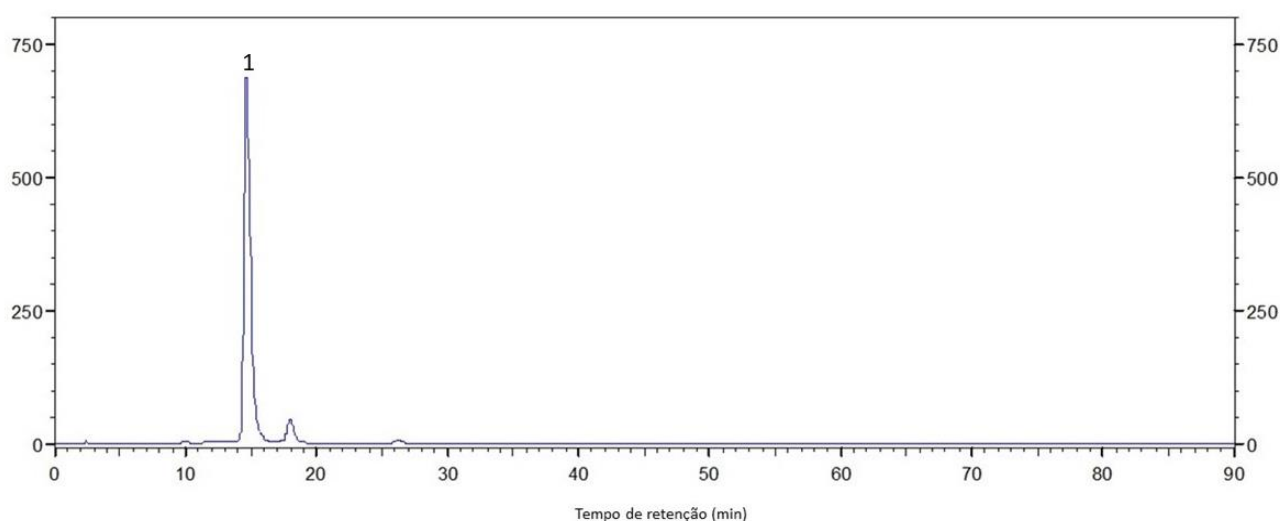


Figura 15. Cromatograma obtido por análise HPLC-DAD para a Fração obtida com 10% MeOH.

Os resultados provenientes da análise da percentagem de cianidina-3-glucósido e a respetiva concentração nas diferentes frações do extrato obtidas estão expressos na **Tabela 13**. Os resultados obtidos estão de acordo com o esperado, a fração que possui uma maior quantidade de cianidina-3-glucósido foi a de 10% da segunda extração, uma vez que a maioria da cianidina-3-glucósido é separada com esta percentagem de MeOH ((Guimarães et al., 2018). Também o extrato bruto da segunda extração possui uma maior concentração de cianidina-3-glucósido. O facto das frações da segunda extração possuírem uma maior quantidade de cianidina-3-glucósido pode ser explicado pelo tempo de extração, e o tempo de contacto amora/solvente de extração serem superiores em relação à primeira extração (Mussatto et al., 2011; Xu et al., 2015).

Tabela 13. Valores de percentagem, concentração de cianidina-3-glucósido nos diferentes extratos e massa de extrato pesada (mg).

	% Cianidina-3-glucósido	[Cianidina-3-glucósido] mg/mL (pico 1)	Massa de extrato pesada (mg)
1ª Ext. Ext Bruto	25,679	0,052 ± 0,003	1,31
1ª Ext. 10% MeOH	93,803	0,767 ± 0,002	1,00
1ª Ext. 20% MeOH	83,605	0,446± 0,002	1,09
2ª Ext. Ext Bruto	32,563	0,0582 ± 0,003	1,22
2ª Ext. 10% MeOH	98,7106	1,368 ± 0,004	1,40
2ª Ext. 20% MeOH	45,472	0,177± 0,003	1,73

Desta forma para os ensaios realizados foi utilizado o extrato proveniente da 2ª extração com 10 % de MeOH e o Extrato Bruto proveniente da 2ª extração, por serem as frações com uma maior concentração de cianidina-3-glucósido, que era o composto de interesse para este trabalho.

3.2. Escolha do tampão e do intervalo de valores de pH

A escolha do Tampão foi feita de acordo com as eventuais futuras aplicações dos complexos. Assim, foi estabelecido o uso de um tampão biológico, que não apresentasse toxicidade para o ser humano. O tampão escolhido foi o tampão acetato, uma vez que em ensaios anteriores, outras alternativas de tampões biológicos (Tampão Fosfato e Tampão Citrato) revelaram uma aparente falta de complexação metálica com a antocianina devido às fortes interações do tampão com os metais

(Buchweitz , et al., 2012). Também a ampla gama de pHs do Tampão Acetato foi um fator importante para a escolha do mesmo.

O intervalo de valores de pH escolhido está relacionado com o facto da maioria dos alimentos possuírem um pH ácido (entre 3 a 6), desta forma selecionaram-se valores de pH que se encontrassem dentro deste intervalo e se enquadrassem na gama de pHs do tampão (3,7 até 5,6).

3.3. Síntese dos complexos Antocianina-Metal

Após os ensaios preliminares de complexação da cianidina-3-glucósido com metais verificou-se apenas complexação com dois metais dando origem a complexos com cores atrativas (azul-arroxeadas). Estes metais foram o AlCl_3 e FeCl_3 (III), as cores obtidas com os mesmos podem ser observadas na **Figura 16**. Os mesmos também foram os metais escolhidos para os diferentes ensaios uma vez que existe literatura, ainda que escassa, para estes metais complexados com antocianinas.

Os restantes iões metálicos nomeadamente do Acetilacetato de zinco, do Brometo de cobre (II), do Óxido de Zinco, do Sulfato de Cobre e do Sulfato de Cobre penta hidratado, do Sulfato de Magnésio e do Alumen não constituíram alternativas de outros metais para ensaios seguintes por não terem gerado cor em solução com a cianidina-3-glucósido.



Figura 16. Coloração dos complexos de Ferro (A) e Alumínio (B) a pH 4,6.

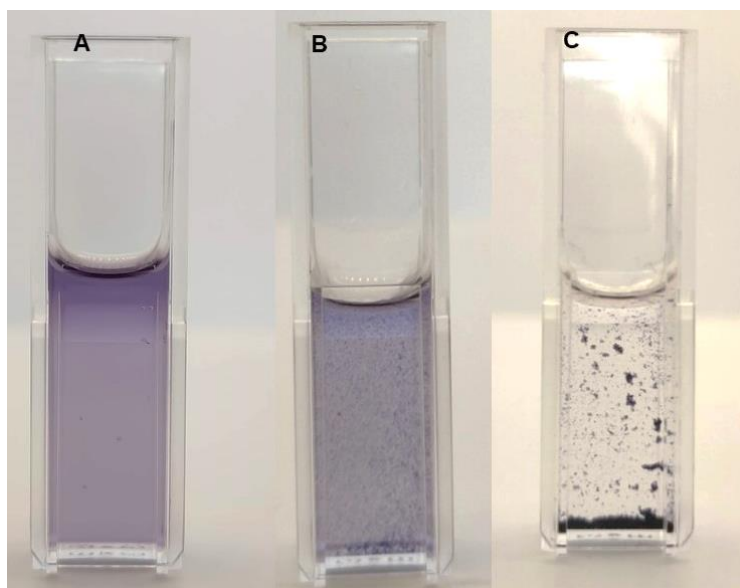


Figura 17. Coloração dos complexos de Ferro e cianidina-3-glucósido pH 3,7 0h (A), 120 min (B) e 180 min (C).

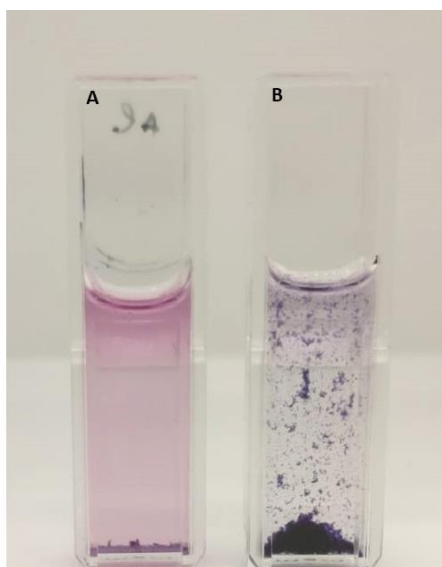


Figura 18 Coloração dos complexos de Alumínio e cianidina-3-glucósido pH 3,7 (A) e pH (4) 20 minutos depois da síntese do complexo.

Os complexos sintetizados com cianidina-3-glucósido e cloreto de ferro (III) e com cloreto de alumínio, numa perspetiva de observador evidenciaram a manutenção da tonalidade ao longo do tempo. No entanto, apesar de a cor aparentar ser estável,

evidenciaram a formação de depósito (precipitado) com o passar do tempo como é possível observar na **Figura 17** e **Figura 18**.

Para analisar se essa formação de depósito alterava a cor dos complexos, foi utilizado o sistema standard de coordenadas de cor CIE L*a*b* (**Figura 19**).

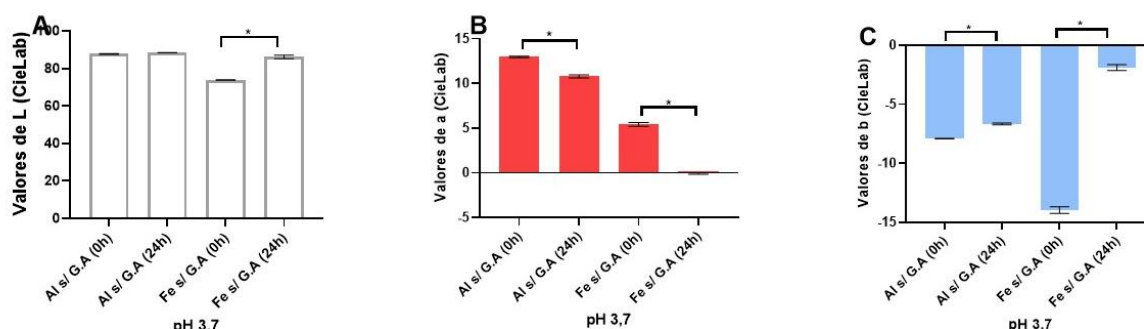


Figura 19. Valores de L* (A), a* (B) e b* (C) dos complexos de Antocianina-Alumínio e Antocianina-Ferro com Goma Arábica 0,7% 0h e 24h após a formação dos complexos a pH 3,7. * p < 0,05, diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes condições dos extratos.

Os resultados evidenciados na **Figura 19** revelaram uma diferença significativa entre a claridade (maiores valores de “L”) da amostra nos complexos Ferro-Cianidina entre as 0h e as 24h de formação do complexo, este aumento deste valor com o tempo pode estar relacionado com a diminuição da vibrância de cor da amostra e atenuação da tonalidade do complexo com a deposição do precipitado. Em relação aos restantes valores foi evidenciado uma diminuição significativa dos valores de “a” (perda de vermelho) e de “b” (perda de azul), podendo concluir que os complexos possuem diferença significativa de cor (total) ao longo de 24h.

No que diz respeito à ocorrência de precipitação uma explicação para este fenómeno foi sugerida por Mcdonald et al. (1996) que estudou a complexação de polifenóis de baixo peso molecular (taninos) com dois metais bivalentes. Concluiu que esta complexação pode influenciar a solubilidade tanto do fenol como do metal através de: formação de um complexo sem carga pelo catião metálico; redução da polaridade da molécula do fenol; formação de complexos com um peso molecular elevado que tenha

resultado na sua precipitação. Apesar dos taninos em questão terem um peso molecular superior ao da cianidina-3-glucósido, o fenómeno que foi proposto para explicar a precipitação dos complexos pode explicar o ocorrido com a cianidina-3-glucósido no presente trabalho. Apesar da concentração de antocianinas usada ser a máxima aceite (segundo a bibliografia) para que não ocorra auto-associação, não é possível garantir que tal não aconteça. Assim sendo, e uma vez que estas interações consistem no empilhamento vertical de moléculas de antocianinas (Yoshida et al., 1991), poderá ter dado origem a agregados com um peso molecular mais elevado que terá provocado a sua precipitação.

3.3.1. Estudo da precipitação

3.3.1.1. Realização de cinéticas

Como forma de analisar a precipitação de ambos os complexos (Alumínio-Cianidina e Ferro-Cianidina), foram traçados os espectros de absorção com diferentes intervalos de tempo com diferentes pHs de modo a perceber como variava a precipitação dos complexos com a variação do pH.

Os resultados obtidos com os espectros de absorção dos complexos de Alumínio-Cianidina ao longo do tempo revelaram Efeitos hipocrómicos mais acentuados com o aumento de pH com o passar do tempo (**Figura 21 - Figura 24**).

Os resultados relativamente aos espectros de absorção dos complexos de Alumínio revelam um efeito batocrómico nos pHs 3,7 e 4 e um efeito hipocrómico a cada 10 minutos em todos os pHs. Nos valores de pH mais baixos o efeito hipocrómico foi mais baixo tendo aumentado com o aumento de pH. Este efeito hipocrómico mais acentuado está de acordo com o esperado uma vez que uma diminuição na absorvância máxima significa menor intensidade de cor. Os complexos com o aumento de pH evidenciaram uma precipitação mais acentuada tendo ficado o solvente aparentemente incolor, o que explica o comportamento dos espectros de absorção. Com o aumento de pH verifica-se um aumento da proporção de base quinoidal (**Figura 20**) (Cruz et al., 2020; Stintzing et al., 2002) que complexa com o metal em questão.

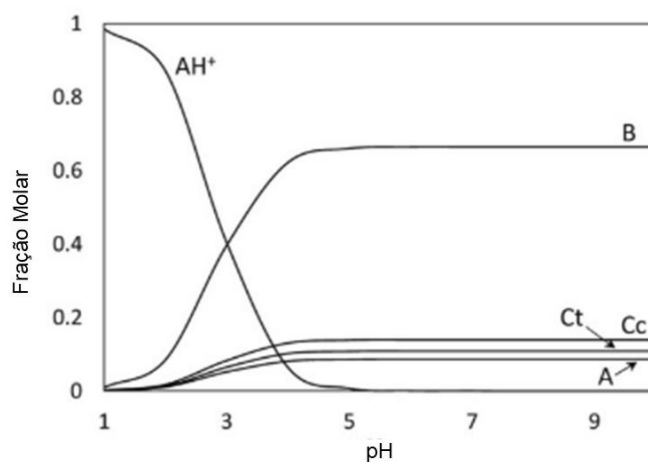


Figura 20. Distribuição das Frações Molares das espécies em equilíbrio da Cianidina-3-Glucósido em função do pH em água: Catião Flavílio (AH^+), cis-Chalcona (Cs), trans-Chalcona (Ct), Base Quinoidal (A) e Forma Hemicetal (B). (Adaptado de ((Cruz et al., 2020)).

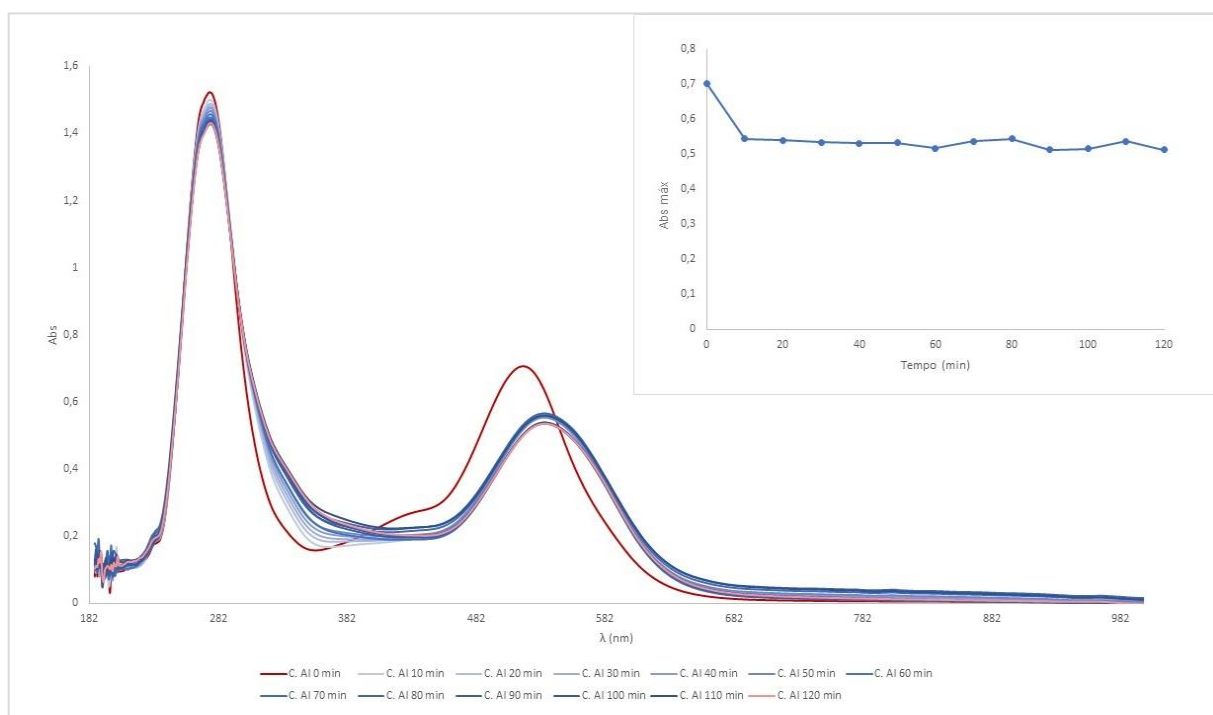


Figura 21. Espectro de Absorção do Complexo de Alumínio-Cianidina durante 120 minutos pH 3,7. *Inset:* Variação da absorância máxima do complexo Alumínio-Cianidina pH 3,7 durante 120 minutos.

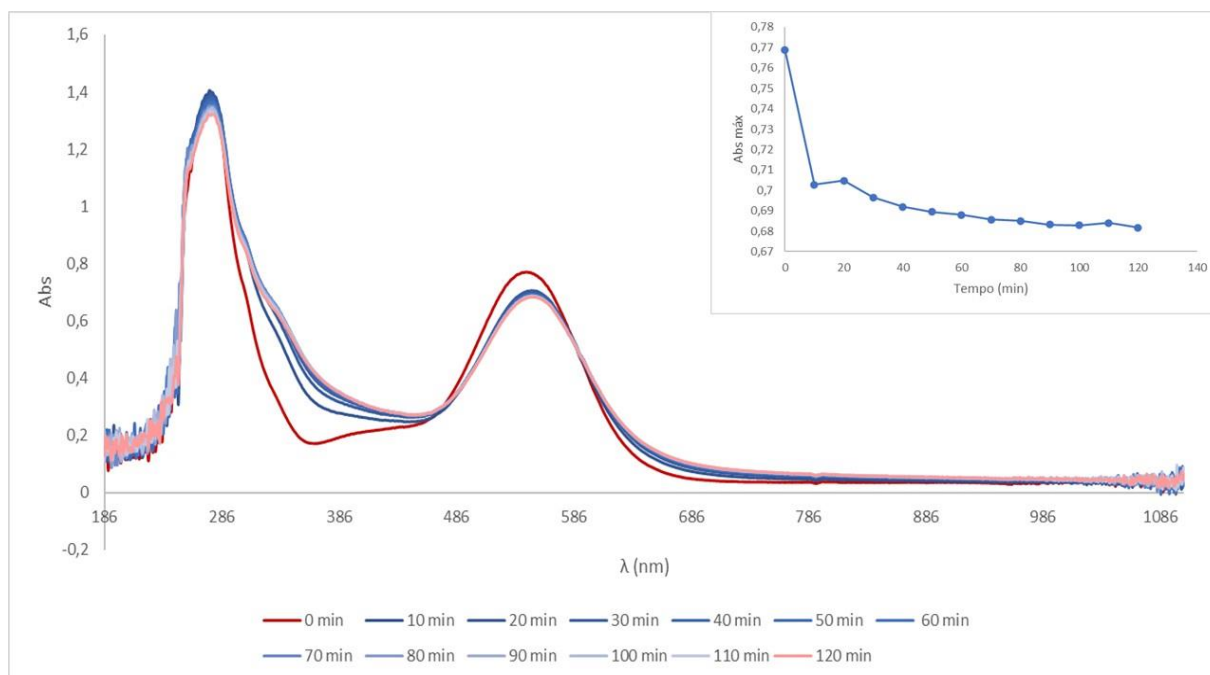


Figura 22. Espectro de Absorção do Complexo de Alumínio-Cianidina durante 120 minutos pH 4. *Inset:* Variação da absorbância máxima do complexo Alumínio-Cianidina pH 4 durante 120 minutos.

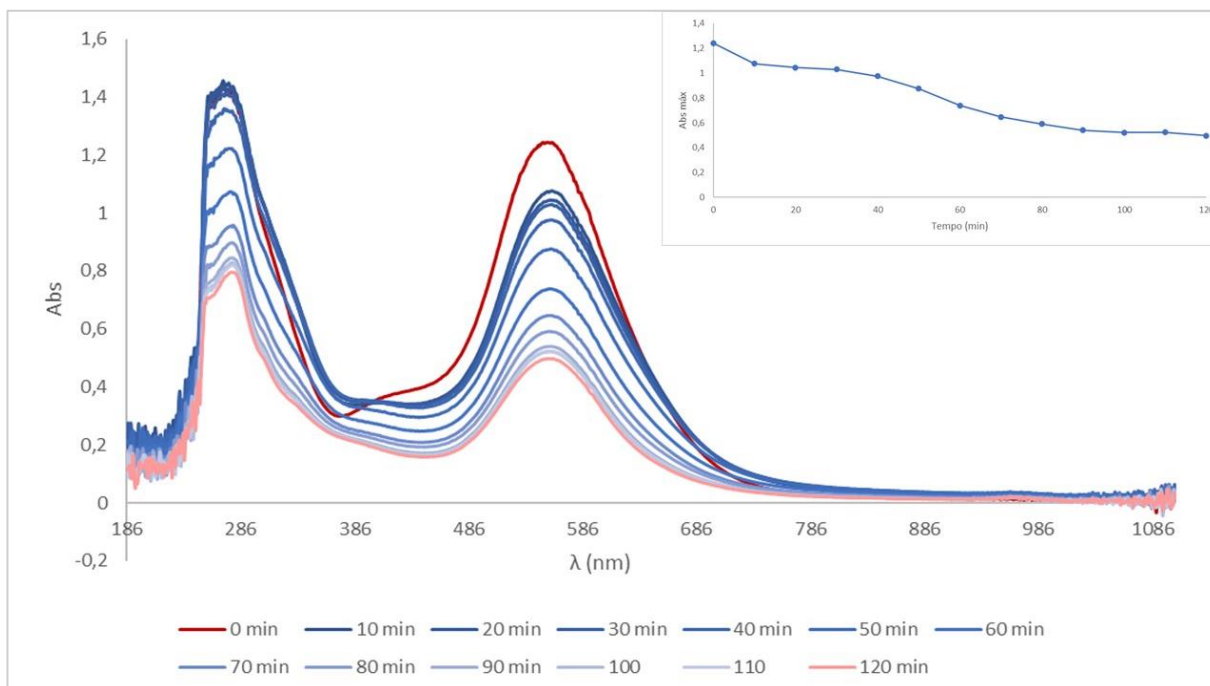


Figura 23. Espectro de Absorção do Complexo de Alumínio-Cianidina durante 120 minutos pH 4,6. *Inset:* Variação da absorbância máxima do complexo Alumínio-Cianidina pH 4,6 durante 120 minutos.

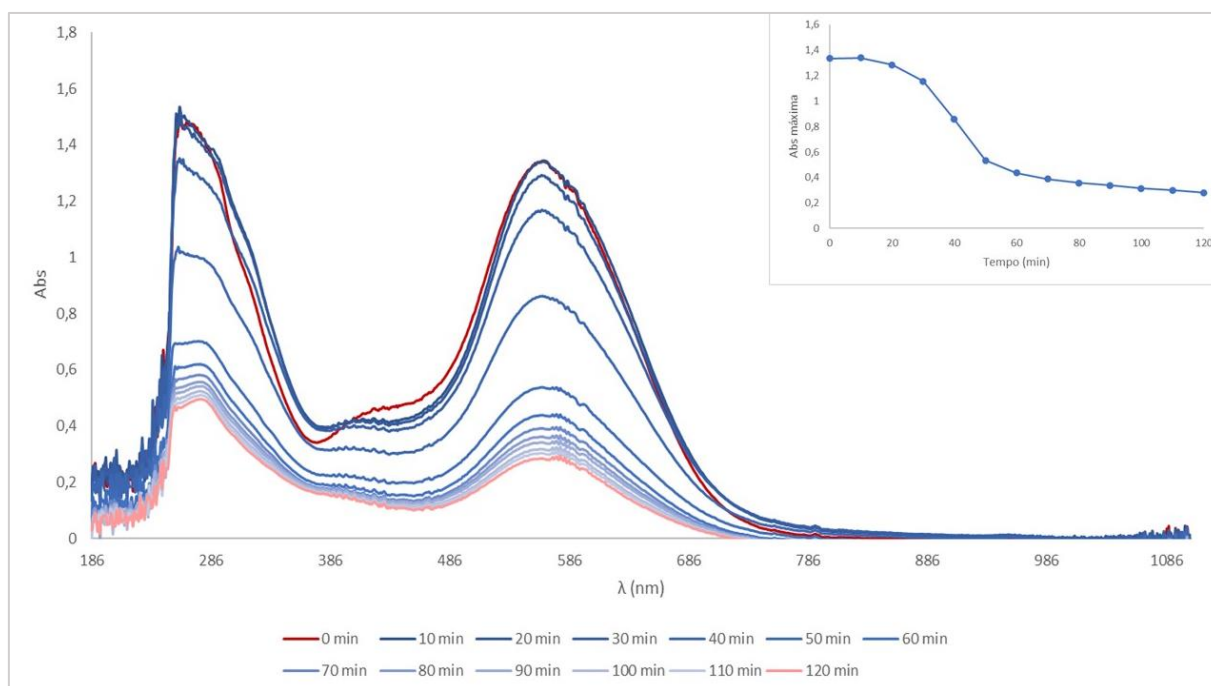


Figura 24. Espectro de Absorção do Complexo de Alumínio-Cianidina durante 120 minutos pH 5,6. *Inset:* Variação da absorbância máxima do complexo Alumínio-Cianidina pH 5,6 durante 120 minutos.

Os resultados relativos às cinéticas dos complexos Ferro-Cianidina podem ser observados na **Figura 25**, **Figura 26** e **Figura 27**. O espectro de absorção do complexo Ferro-Antocianina a pH 3,7 ao longo de 120 minutos também evidenciou um efeito batocrômico (**Figura 25**). À semelhança dos complexos de alumínio e cianidina-3glucósido, foi possível observar um efeito hipocrômico no entanto mais notório em todos os pHs. Estes resultados estão de acordo com o esperado uma vez que o ferro evidenciou uma maior e mais rápida precipitação. Também foi possível observar um maior efeito batocrômico nos complexos de ferro a pH 3,7 e 4 em relação aos complexos de alumínio. Estas diferenças entre os dois metais estão de acordo com o esperado uma vez que existem estudos que evidenciam maiores diferenças no espectro de absorção com o Ferro do que no Alumínio (Sigurdson et al., 2016).

Também a aparente falta de solubilidade de iões de ferro em soluções aquosas pode estar na origem da precipitação e da consequente diferença nos espectros uma vez que faz parte da composição dos mesmos. Como solução alguns autores sugeriram em

trabalhos anteriores que evidenciaram a precipitação do metal o uso de uma substância quelante para auxiliar a solubilização do mesmo (Aslamkhan et al., 2002).

Outra explicação para o sucedido que pode ser considerada para os resultados obtidos com ambos os complexos, é haver um excesso de iões metálicos em solução e a proporção de 1:1 Antocianina:Metal não ser a adequada. Sigurdson et al. (2016) procurou estudar o comportamento de diferentes rácios de vários metais complexados com antocianinas a diferentes pHs e evidenciou que os complexos com concentrações mais elevadas de metais apresentaram um maior efeito hipocrómico em relação a concentrações menores do mesmo metal.

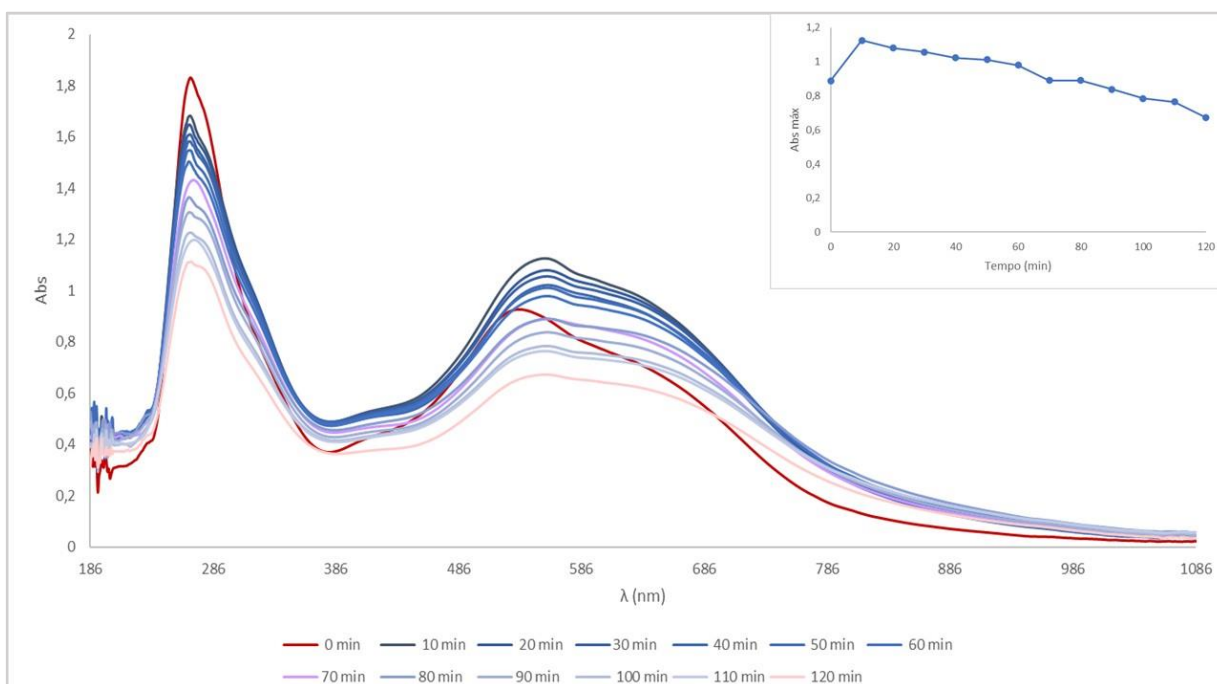


Figura 25. Espectro de Absorção do Complexo de Ferro-Cianidina durante 120 minutos pH 3,7. *Inset:* Variação da absorbância máxima do complexo Ferro-Cianidina pH 3,7 durante 120 minutos

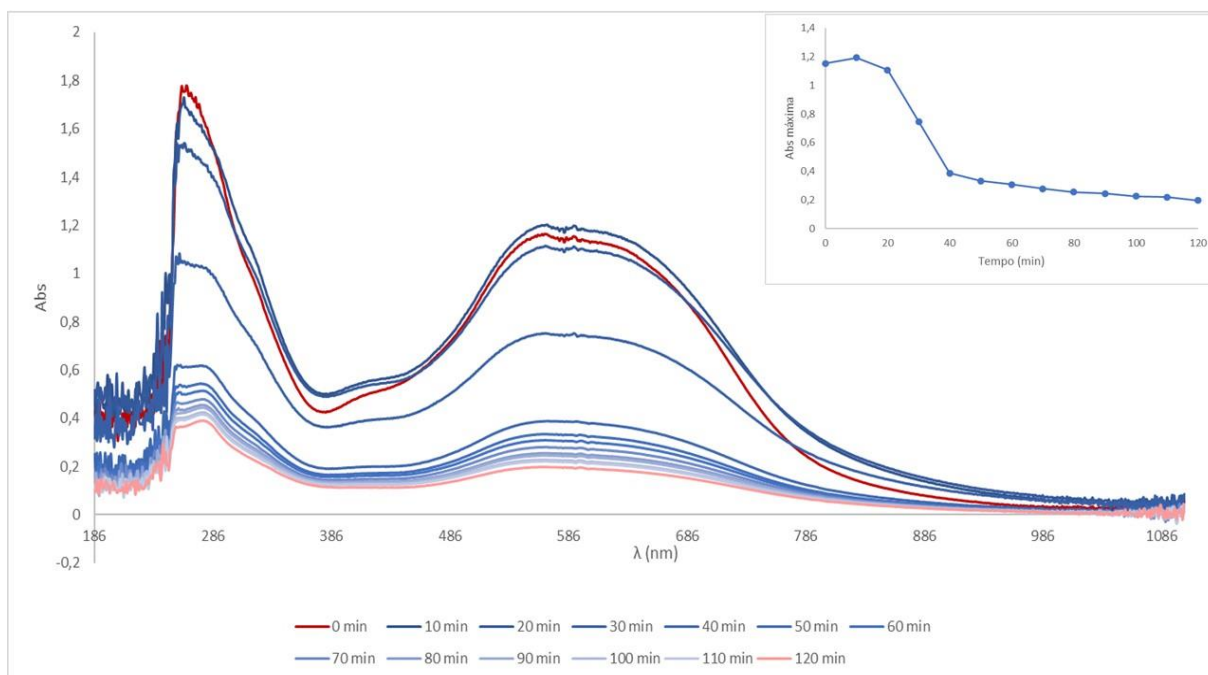


Figura 26. Espectro de Absorção do Complexo de Ferro-Cianidina durante 120 minutos pH 4,6. *Inset:* Variação da absorbância máxima do complexo Ferro-Cianidina pH 4,6 durante 120 minutos.

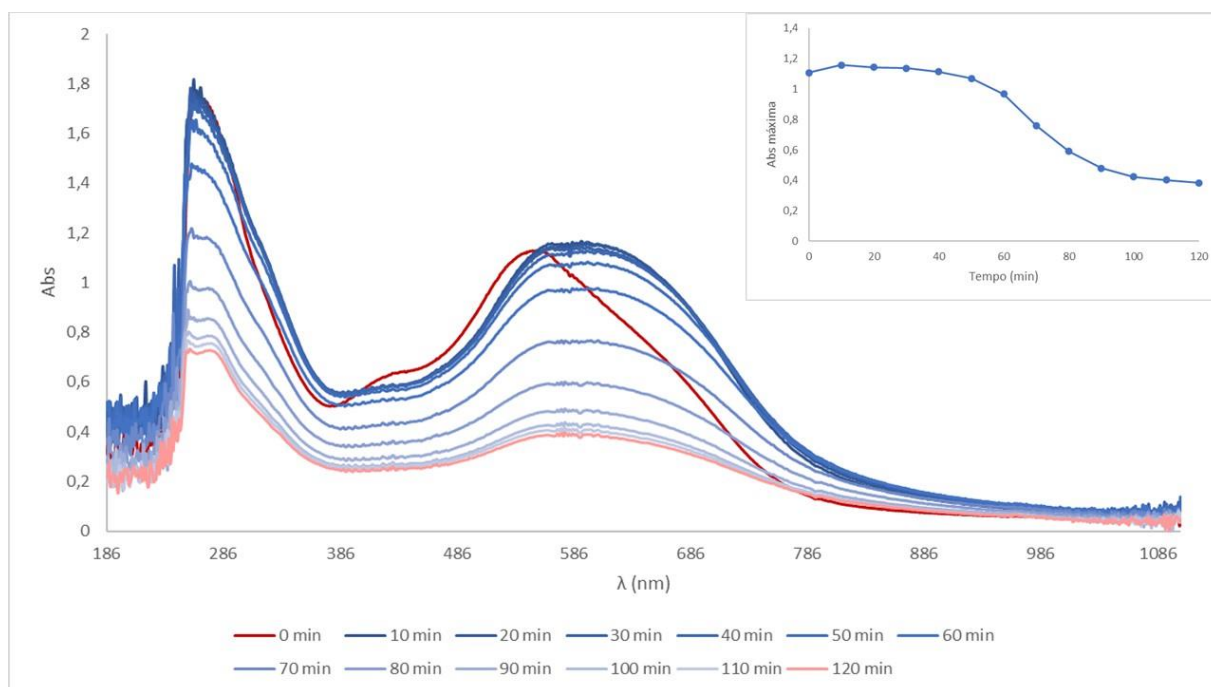


Figura 27. Espectro de Absorção do Complexo de Ferro-Cianidina durante 120 minutos pH 5,6. *Inset:* Variação da absorbância máxima do complexo Ferro-Cianidina pH 5,6 durante 120 minutos.

De uma forma geral, os resultados dos complexos com ambos os metais evidenciam uma diferença nos espectros obtidos. Os complexos Ferro-Cianidina em relação aos complexos de Alumínio-Cianidina apresentaram uma maior precipitação e um efeito hipocrómico mais acentuado com o aumento do pH. Os resultados comparativos entre os dois metais estão de acordo com o esperado uma vez que estudos anteriores comprovaram uma maior influência do ferro em relação ao alumínio no deslocamento do espectro de absorção. Concentrações menores de ferro evidenciaram um maior efeito batocrómico em relação a uma maior concentração de alumínio. Este efeito é possivelmente explicado pela configuração eletrónica única dos iões Fe^{3+} que promove a sua complexação (Sigurdson et al., 2016).

3.3.2. Adição de Goma Arábica

Como forma de evitar a precipitação dos complexos metal-antociânicos utilizou-se Goma Arábica como agente ligante do complexo de forma a evitar a formação de precipitado no mesmo (**Figura 28**).



Figura 28. Complexo com ferro e antocianina pH 3,7 0h após a formação do complexo (A) e 2 horas depois (B)

Buchweitz et al., (2012a) em estudos anteriores procurou estabilizar complexos antocianina-metal com pectinas obtidas de diferentes extratos. À semelhança das pectinas, a goma arábica é um polissacárido com propriedades estabilizantes e gelificantes e possui a capacidade de aumentar a viscosidade da solução e até formar géis devido ao seu carácter altamente hidrofílico. Para além disso o uso de goma arábica em sinergia com um ião metálico Fe^{2+} evidenciou em estudos anteriores a estabilidade de outro composto com propriedades corantes, a norbixina (carotenoide) evitando a sua precipitação (Guan & Zhong, 2014).

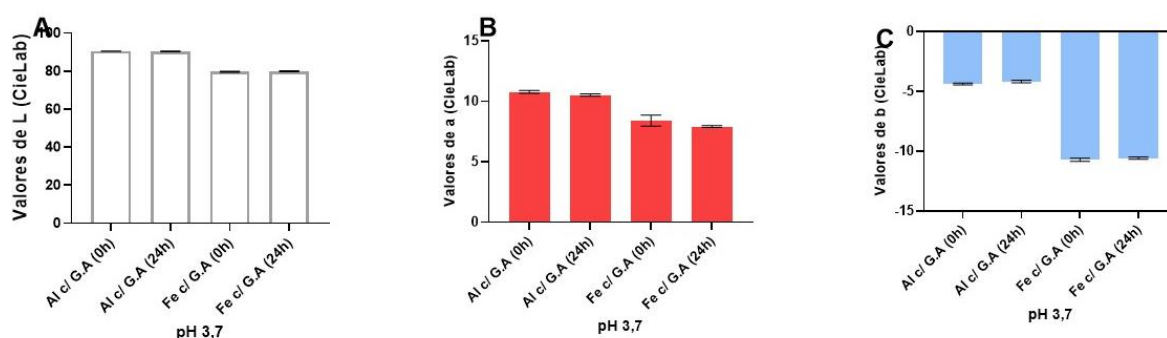


Figura 29. Valores de L^* (A), a^* (B) e b^* (C) dos complexos de Antocianina-Alumínio e Antocianina-Ferro com Goma Arábica 0,7% 0h e 24h após a formação dos complexos a pH 3,7.

A análise dos resultados das coordenadas de CIE $L^*a^*b^*$ dos complexos com Goma Arábica não revelou diferenças significativas entre os complexos 0h e 24h após serem sintetizados (**Figura 29**). Desta forma foi possível concluir que no que toca ao parâmetro da cor, os complexos evidenciaram estabilidade ao pH escolhido.

3.3.2.1. Seleção da percentagem de goma arábica (% (m/m))

Com o objetivo de estabilizar o complexo de forma a evitar a sua precipitação foi selecionado um valor de pH representativo para cada um dos complexos metálicos e foram testadas três concentrações distintas de goma arábica a um pH de 3,7, com o objetivo de analisar qual das percentagens resultaria na melhor tonalidade e evidenciaria uma maior quantidade de cor azul na matriz.

Os resultados das coordenadas do CIE $L^*a^*b^*$ em ambos os complexos evidenciaram pouca variância entre os valores de L^* (claridade da amostra) e valores de a^* (quantidade de cor vermelha) em ambos os complexos. Apesar dos mesmos apresentarem diferenças significativas para os valores de L^* e a^* entre quase todas as percentagens de Goma arábica e entre todas as percentagens para as quantidades de Goma arábica para os valores de a^* (**Figura 30** e **Figura 31**). Destacando os valores de b^* , a percentagem de goma arábica que evidenciou maiores valores para as coordenadas de azul foi 0,7%.

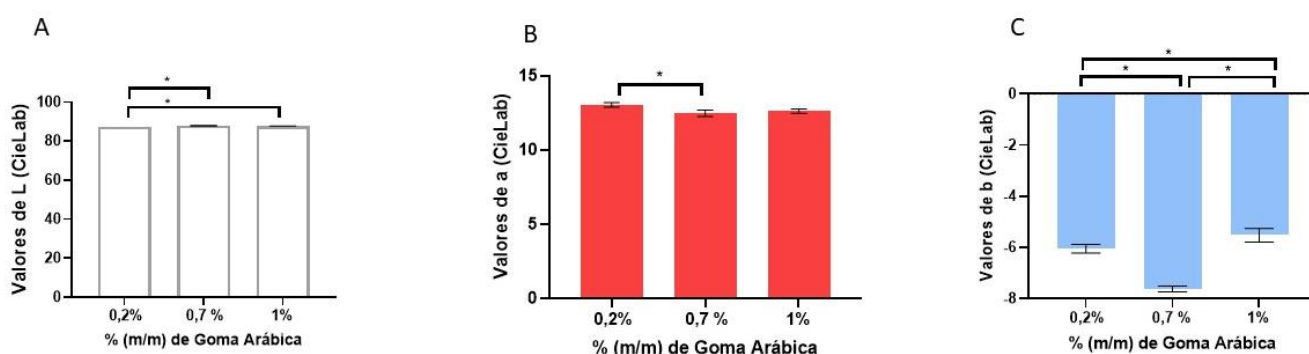
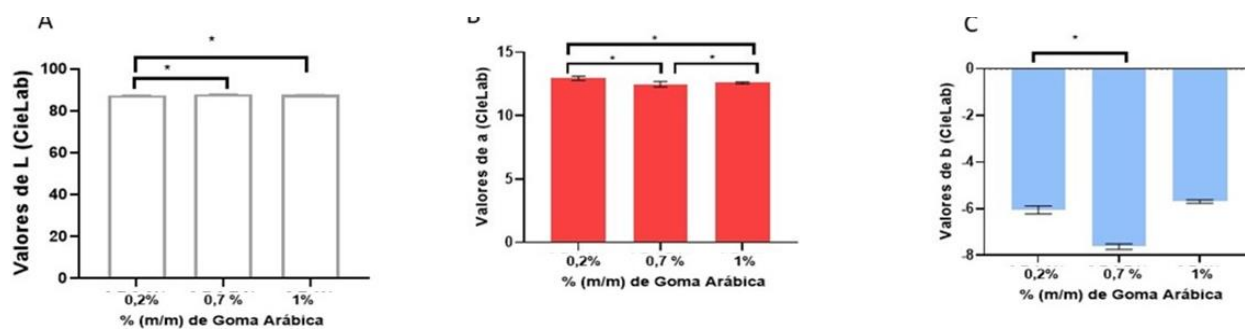


Figura 30. Valores de L (A), a (B) e b (c) dos complexos de Antocianina-Alumínio com diferentes percentagens (m/m) (0,2%,0,7% e 1% de Goma Arábica a pH 3,7). * $p < 0,05$, diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes condições dos extratos.

Os resultados das coordenadas do CIE $L^*a^*b^*$ nos complexos de ferro não evidenciaram diferenças significativas entre as diferentes percentagens de goma arábica para os valores de L^* e a^* , no entanto mostraram que para o parâmetro b^* as amostras apresentavam diferenças significativas. Novamente, a percentagem de 0,7% evidenciou no complexo uma ligeira maior quantidade de azul em relação às restantes percentagens, assim sendo os ensaios seguintes foram realizados com esta

Figura 31. Valores de L (A), a (B) e b (c) dos complexos de Antocianina-Ferro com diferentes percentagens (m/m) (0,2%,0,7% e 1% de Goma Arábica a pH 3,7). * $p < 0,05$, diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes condições dos extratos.



percentagem. A concentração de goma arábica utilizada também foi igual à usada por Buchweitz et al. (2012a) nos ensaios de estabilização de antocianinas de beterraba com pectinas.

3.3.2.2. Realização de cinéticas

De forma a analisar se os resultados obtidos com as coordenadas colorimétricas estariam corretos, os espectros de absorção dos complexos com goma arábica 0,7% (m/m) foram traçados para ambos os metais. Dentro dos pHs escolhidos para os ensaios anteriores, selecionou-se o menor e o maior valor (3,7 e 5,6 respetivamente) pelo facto dos complexos apresentarem comportamentos bem distintos a estes valores nos complexos sem o polissacárido (**Figura 32-Figura 35**). Os intervalos de tempo para as cinéticas mantiveram-se para os complexos elaborados com alumínio uma vez que apresentavam uma maior estabilidade a olho nu nos complexos sem goma arábica. As cinéticas dos complexos de ferro com goma arábica foram obtidas com intervalos de tempo superiores (840 min) de forma a perceber se o comportamento dos mesmos se mantinha num intervalo de tempo superior.

Os complexos sintetizados com alumínio apresentaram uma estabilidade de cor para ambos os pHs, uma vez que os espectros de absorção evidenciaram um efeito hipocrómico muito reduzido com o decorrer do tempo (**Figura 32 e Figura 33**). Em relação aos complexos de ferro, mesmo com goma arábica, esta foi possível observar uma maior instabilidade de cor através dos espectros de absorção nos complexos sintetizados aos dois pHs (**Figura 34 e Figura 35**). A pH 3,7 é evidenciado um efeito hipercrómico acentuado ao longo do tempo, o que leva a concluir que houve uma alteração da cor. Os resultados estão de acordo com o esperado, reforçando os resultados dos ensaios anteriores que destacam a maior instabilidade dos complexos sintetizados com FeCl_3 . É possível então concluir que a percentagem de goma arábica usada não terá sido suficiente para garantir a estabilidade do complexo, ainda que a olho nu não tenham sido observadas diferenças e as coordenadas colorimétricas não tenham evidenciado diferenças. Uma maior instabilidade a pHs mais baixos também era expectável em matrizes que utilizem goma arábica na sua constituição. Panteloglou et al. (2010) concluiu que géis com goma arábica apresentavam diferentes comportamentos dependendo do pH do tampão usado. Apesar de se tratar

de trabalhos experimentais distintos, é possível comparar o comportamento da goma arábica que evidenciou propriedades viscoelásticas mais fracas a pHs inferiores, enquanto que em valores de pH superiores apresentaram um melhor desempenho na matriz. Este comportamento poderá também explicar a menor estabilidade do complexo de ferro a pH 3,7 e maior variação do espectro de absorção do mesmo.

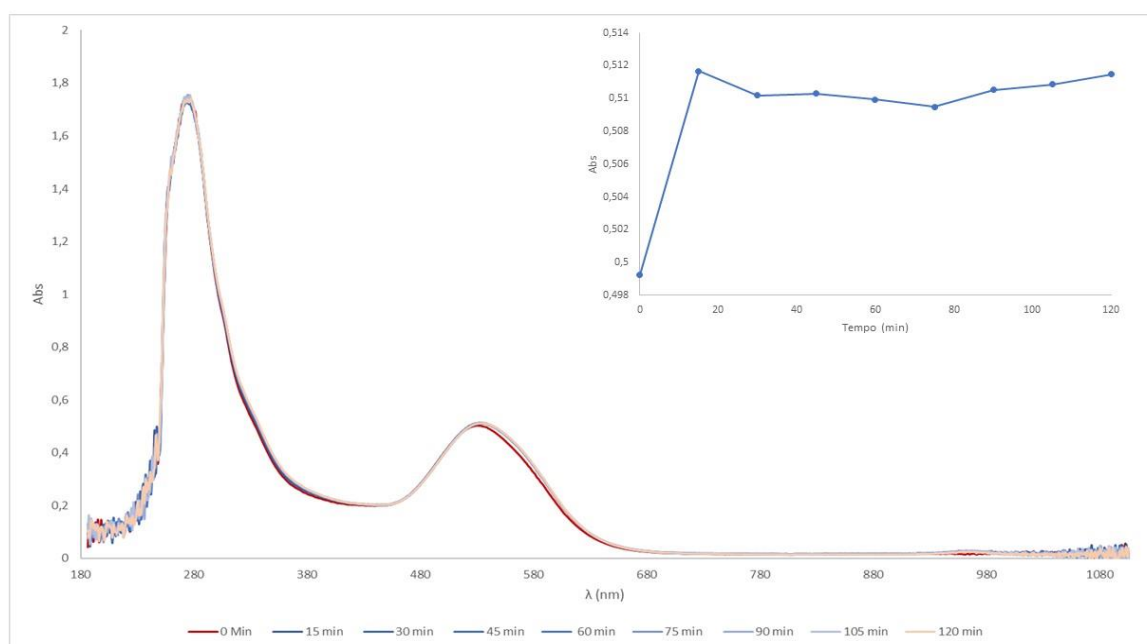


Figura 32. Espectro de Absorção do Complexo de Alumínio-Cianidina com Goma Arábica 0,7% (m/m) durante 120 minutos pH 3,7. *Inset:* Variação da absorbância máxima do complexo Alumínio-Cianidina com G.A. 0,7% (m/m) pH 3,7 durante 120 minutos.

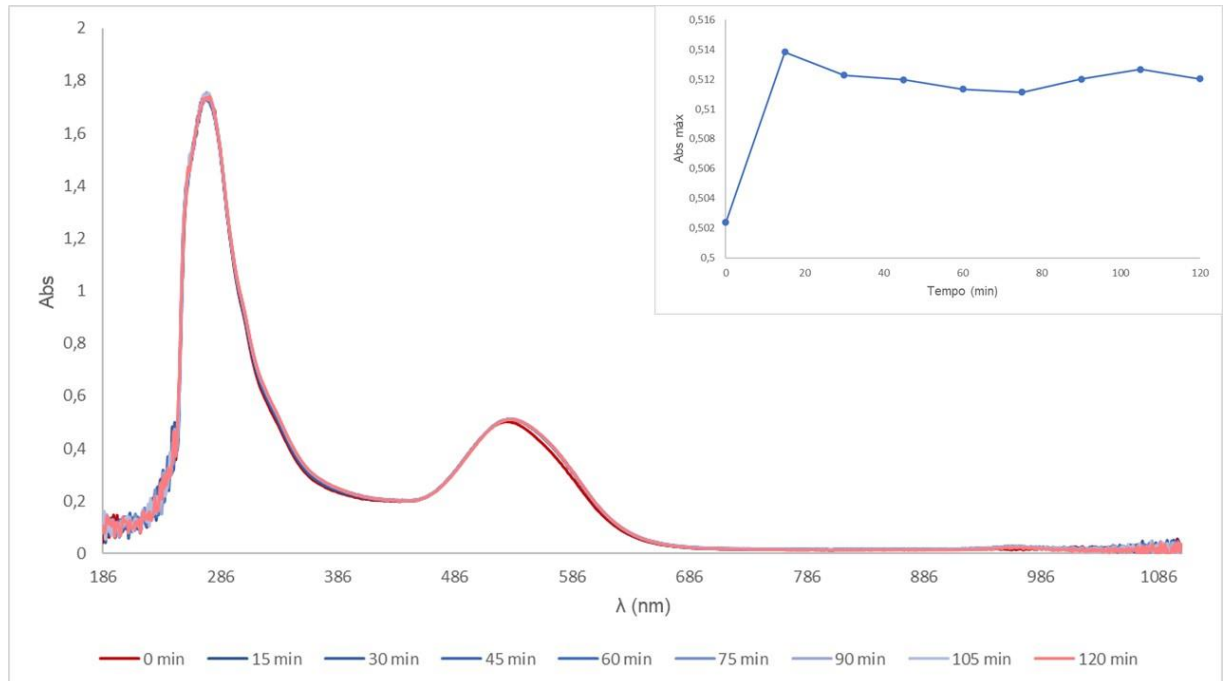


Figura 33. Espectro de Absorção do Complexo de Alumínio-Cianidina com Goma Arábica 0,7% durante 120 minutos pH 5,6. Inset: Variação da absorbância máxima do complexo Alumínio-Cianidina com G.A 0,7% pH 3,6 durante 120 minutos

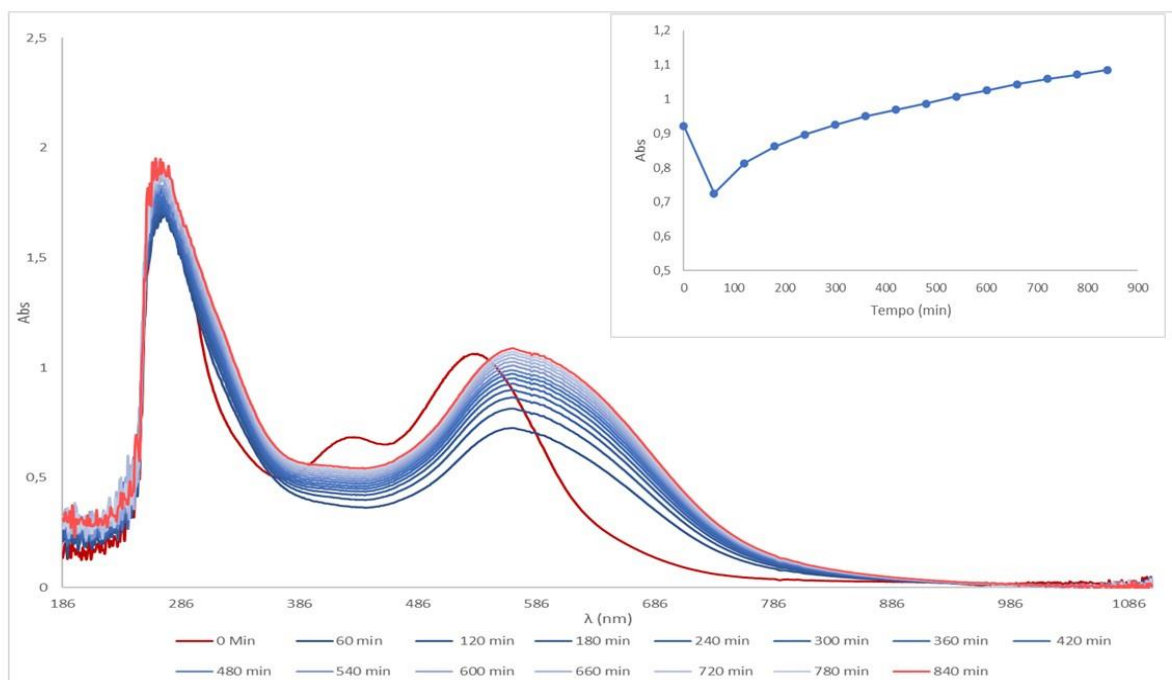


Figura 35. Espectro de Absorção do Complexo de Ferro-Cianidina com Goma Arábica 0,7% durante 120 minutos pH 3,7. Inset: Variação da absorbância máxima do complexo Ferro-Cianidina com G.A 0,7% pH 3,7 durante 120 minutos

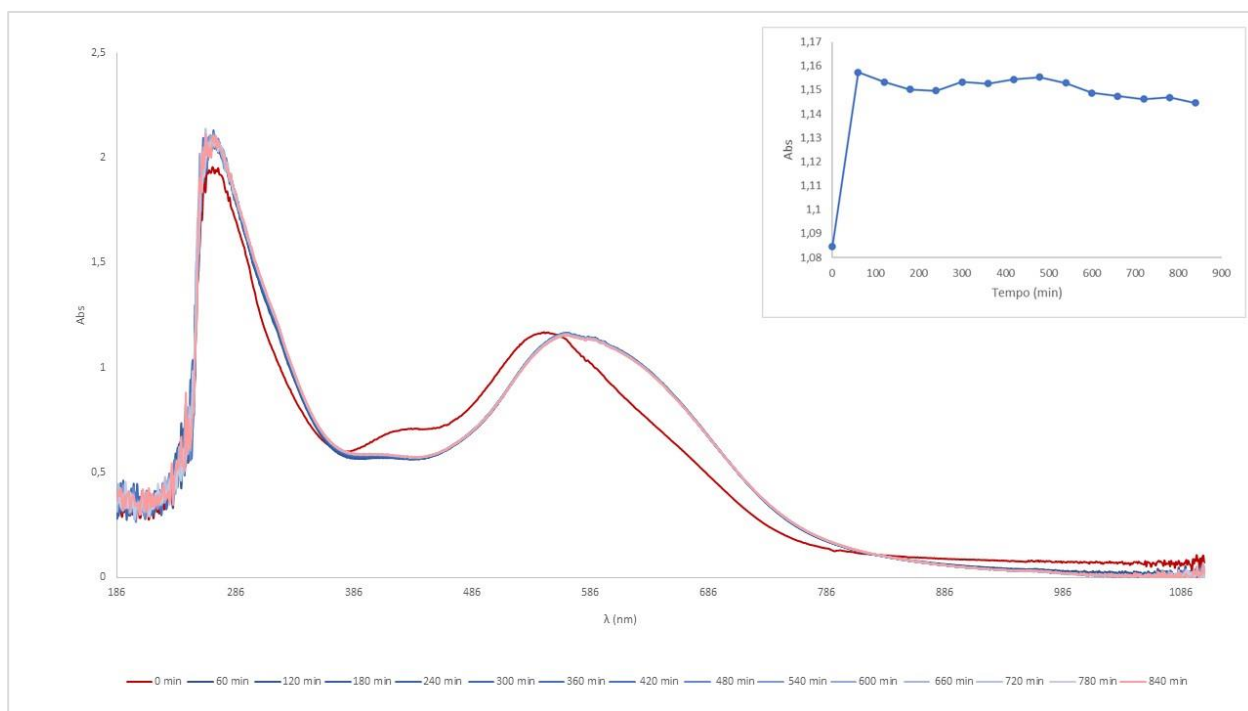


Figura 34. Espectro de Absorção do Complexo de Ferro-Cianidina com Goma Arábica 0,7% durante 120 minutos pH 5,6. Inset: Variação da absorbância máxima do complexo Ferro-Cianidina com G.A 0,7% pH 5,6 durante 120 minutos.

3.4. Ensaio de estabilidade de cor

3.4.1. Extrato Bruto

Ensaio preliminar com o extrato bruto utilizando uma concentração de 1 mg/mL evidenciaram alguma complexação metal-extrato bruto, uma vez que deu origem a uma solução de cor azul/arroxada, mas muito tênue. Por isso a concentração de extrato bruto foi aumentada para o triplo (3 mg/mL).

Foi analisada a estabilidade de cor de cada complexo metálico com goma arábica entre 0h e 24h após a formação do complexo, para isso selecionou-se o mesmo pH representativo de ensaios anteriores: 3,7 (**Figura 36**).

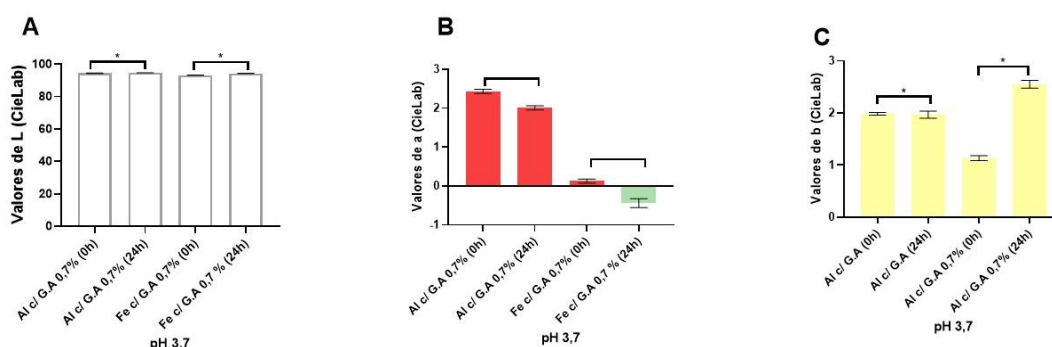


Figura 36. Valores de L* (a), a* (B) e b* (c) dos complexos com extrato bruto e Alumínio e Ferro a pH 3,7 0h e 24h após os complexos. * $p < 0,05$, diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes condições dos extratos

A análise de coordenadas de cores geradas pelo Cie L*a*b* evidenciaram uma diferença significativa entre as 0h e as 24h nos complexos sintetizados com ambos os metais. Observou-se também uma tendência de perda de cor vermelha (menores valores de a*) e aumento da cor amarela (maiores valores de b* com o passar das 24 horas, esta diferença foi mais notória nos complexos de ferro. Esta variação dos valores resultou numa alteração da cor dos complexos que pode ter ocorrido pelo facto do extrato usado ser um extrato bruto e, por isso, possuir uma percentagem de cianidina-3-glucósido de aproximadamente 32,5 % face aos 98 % do extrato usado para os restantes ensaios. Esta menor percentagem de cianidina-3-glucósido terá resultado numa menor eficiência de complexação metálica e consequente degradação

da cor. Outra possibilidade para explicar o ocorrido é a presença de outros compostos no extrato, por exemplo polifenóis incolores que oxidam a compostos amarelos, e que esses mesmos compostos tenham influenciado significativamente o espectro de absorção dos complexos e consequentemente as coordenadas colorimétricas tendo resultado essencialmente num aumento da cor amarela. O facto destes mesmos compostos incolores poderem formar complexos com o ferro e o alumínio entrando em competição com a antocianina. A possibilidade de ocorrer este fenómeno pode justificar a ocorrência de uma cor ténue nos complexos com extrato bruto uma vez que não há tanto metal livre para complexar com a cianidina e formar o complexo (Buchweitz et al., 2012a).

Tabela 14. Valores de ΔL , Δa , Δb e TDC (diferença total de cor) entre os complexos formados com extrato bruto-Alumínio e Cianidina-Alumínio a diferentes pHs.

	ΔL	Δa	Δb	TDC
3,7	$6,52 \pm 0,09$	$-10,0 \pm 0,2$	$7,93 \pm 0,02$	$14,4 \pm 0,2$
4	$6,5 \pm 0,1$	$-10,36 \pm 0,04$	$8,96 \pm 0,05$	$15,16 \pm 0,1$
4,6	$12,4 \pm 0,2$	$-10,3 \pm 0,1$	$15,5 \pm 0,2$	$22,3 \pm 0,4$
5,2	$16,8 \pm 0,1$	$-10,0 \pm 0,2$	$19,2 \pm 0,2$	$27,4 \pm 0,2$
5,6	$18,5 \pm 0,5$	$-9,8 \pm 0,3$	$20,6 \pm 0,4$	$29,4 \pm 0,4$

Os resultados obtidos com os valores de ΔL , Δa , Δb e TDC dos complexos Extrato Bruto-Alumínio em relação aos complexos formados com o extrato rico em cianidina-3-glucósido estão presentes na **Tabela 14**. Os resultados evidenciaram um aumento da claridade da amostra (maiores valores de L^*), uma perda da cor vermelha (menores valores de a^*) e um aumento da cor amarela (maiores valores de b^*).

Os resultados estão de acordo com o esperado, uma vez que com o aumento de pH existem mais espécies incolores/amarelas da antocianina (chalconas e base hemiacetal) o que poderá estar na origem do aumento da cor amarela com o aumento de pH. Outra explicação para o aumento da coloração amarela com o aumento do pH foi a concentração de metal utilizada. Tendo em conta que a concentração de metal usada foi a mesma nos complexos com o extrato rico em cianidina-3-glucósido, a quantidade de metal poderia ter estado em excesso, uma vez que os complexos com

extrato bruto possuíam uma menor percentagem de cianidina-3-glucósido que terá complexado com o metal.

Tabela 15. Valores de ΔL , Δa , Δb e TDC (diferença total de cor) entre os complexos formados com Extrato bruto-Ferro e Cianidina-Ferro e a diferentes pHs.

	ΔL	Δa	Δb	TDC
3,7	$19,4 \pm 0,3$	$-9,2 \pm 0,2$	$16,3 \pm 0,2$	$26,93 \pm 0,3$
4	$20,1 \pm 0,4$	$-8,0 \pm 0,2$	$16,5 \pm 0,3$	$27,2 \pm 0,3$
4,6	$20,8 \pm 0,3$	$-5,20 \pm 0,06$	$18,5 \pm 0,3$	$28,3 \pm 0,2$
5,2	$19,4 \pm 0,3$	$-4,0 \pm 0,1$	$17,5 \pm 0,4$	$26,5 \pm 0,2$
5,6	$19,6 \pm 0,4$	$-3,40 \pm 0,07$	$18,3 \pm 0,3$	$27,05 \pm 0,04$

Os resultados obtidos com os valores de ΔL , Δa , Δb e TDC dos complexos Extrato Bruto-Ferro em comparação com os complexos formados com o extrato rico em cianidina-3-glucósido estão expressos na **Tabela 15**. Ao contrário dos complexos formados com o Alumínio não se verificou nenhuma tendência notória com o aumento do pH. No entanto foi possível observar valores mais elevados de TDC para todos os pHs indicando que o ferro apresentou uma maior diferença de cor em relação aos complexos sintetizados com a cianidina-3-glucósido do extrato purificado.

3.4.2. Degradação térmica

Uma vez que o objetivo era encontrar a formulação mais estável para uma futura aplicação em matriz alimentar, apenas foram submetidos a ensaios de degradação térmica as formulações dos complexos com goma arábica, uma vez que não evidenciaram precipitação a olho nu e apresentavam as cores mais atrativas.

Foram feitos também ensaios com a cianidina-3-glucósido e a goma arábica aos diferentes pHs como termo de comparação da antocianina não complexada com os diferentes metais.

Os resultados que são possíveis observar na **Figura 37** evidenciam pouca variação da cor vermelha e um aumento da quantidade da cor amarela com o aumento da temperatura a pH 3,7. Com o aumento de pH houve uma maior diminuição da cor vermelha (valores de “a” mais baixos) e um aumento da cor amarela (valores de “b” mais altos) de uma forma geral. Estes resultados vão de encontro ao esperado, a cianidina-3-glucósido a pHs mais baixos encontra-se sob a sua forma mais estável, o catião flavílio que possui coloração vermelha. A temperatura constitui um dos fatores mais importantes na estabilidade de cor das antocianinas. É posta como hipótese mais aceite que o primeiro passo na degradação térmica das antocianinas é a formação da espécie chalcona (amarela ~~incolor~~) (Markakis et al., 1957; Adams, 1973), explicando a perda de cor vermelha com o aumento da temperatura. De uma forma geral, os fatores estruturais que promove a estabilidade das antocianinas com o pH, aumentam também a sua estabilidade térmica (von Elbe and Schwartz, 1996), explicando assim a maior estabilidade a pHs mais baixos e maior perda de cor com o aumento da cor amarela em pHs mais altos.

As variações na estrutura química das antocianinas são principalmente devido a diferenças no número de hidroxilos presentes na molécula, o grau de metilação de estes grupos OH, a natureza e o número de unidade de açúcar e em certa medida, da natureza e número de ácidos alifáticos ou aromáticos esterificados. Segundo a bibliografia, A degradação é causada principalmente por oxidação, clivagem da ligação covalente ou reações avançadas de oxidação devido ao processamento térmico (Patras et al., 2010).

Os resultados dos complexos de alumínio (**Figura 38**) e ferro (**Figura 39**) evidenciaram também uma relação entre a variação de cor, o pH e temperatura. A análise dos valores de L, a e b gerados pelo CIE*Lab indica uma tendência de menor variação de cor em relação ao pH de 3,7 no caso do alumínio. Foi possível observar uma estabilidade nos valores de L, a e b com o aumento da temperatura ao pH 3,7 que se traduz numa maior estabilidade da quantidade de vermelho e azul, e consequentemente na cor azul-arroxeadada do complexo.

A explicação para a formação de complexos de cor azul/arroxeadada a pHs ácidos está relacionada com a interação dos iões metálicos induzirem a desprotonação do anel benzeno da cianidina-3-glucósido, transformando o catião flavílio em base quinoidal de cor azul e estabilizando a mesma (Moncada et al., 2003; Sigurdson et al., 2017).

Os resultados obtidos através das coordenadas do CIE*Lab evidenciaram diferenças das três variáveis com o aumento da temperatura em todos os pHs exceto no pH 3,7. Os complexos assumem um comportamento semelhante ao da cianidina-3-glucósido com goma arábica, uma vez que a este pH existe uma maior quantidade de catião flavílio que é a espécie mais estável à degradação térmica. Com o aumento de pH existe uma maior percentagem de base quinoidal, mais instável à degradação térmica, explicando assim a diminuição de cor azul com o aumento de pH e de temperatura (menores valores de “b”).

Os resultados com o ferro evidenciaram um comportamento semelhante para todos os pHs sem exceção, evidenciando assim uma maior instabilidade à degradação térmica em relação aos complexos de Alumínio com Goma Arábica.

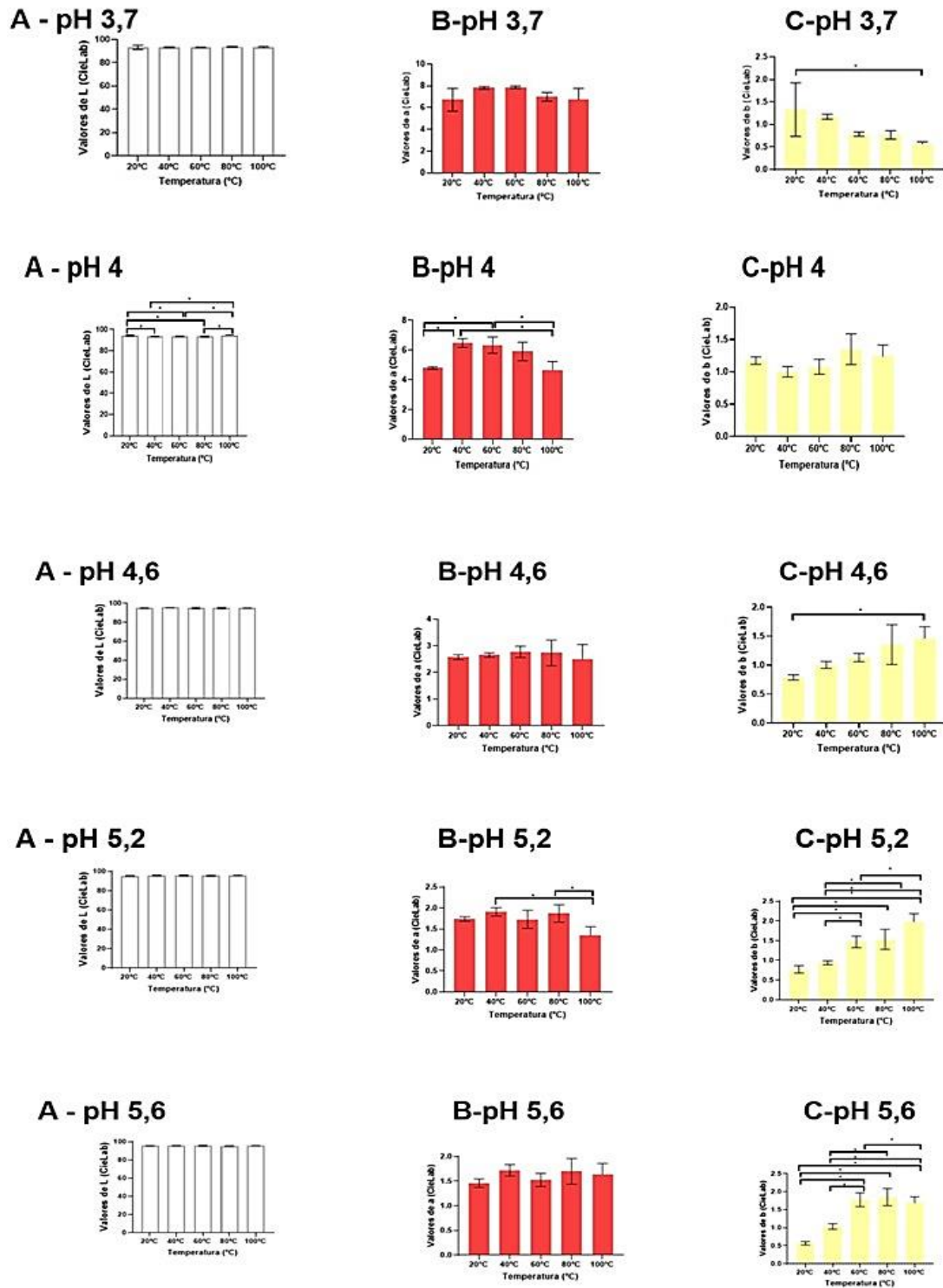


Figura 37. Valores de L* (A), a* (B) e b* (C) dos complexos de Antocianina+ G.A. 0.7% a pH 3,7, 4, 4,6, 5,2 e 5,6 com o aumento de temperatura (20°C-100°C).

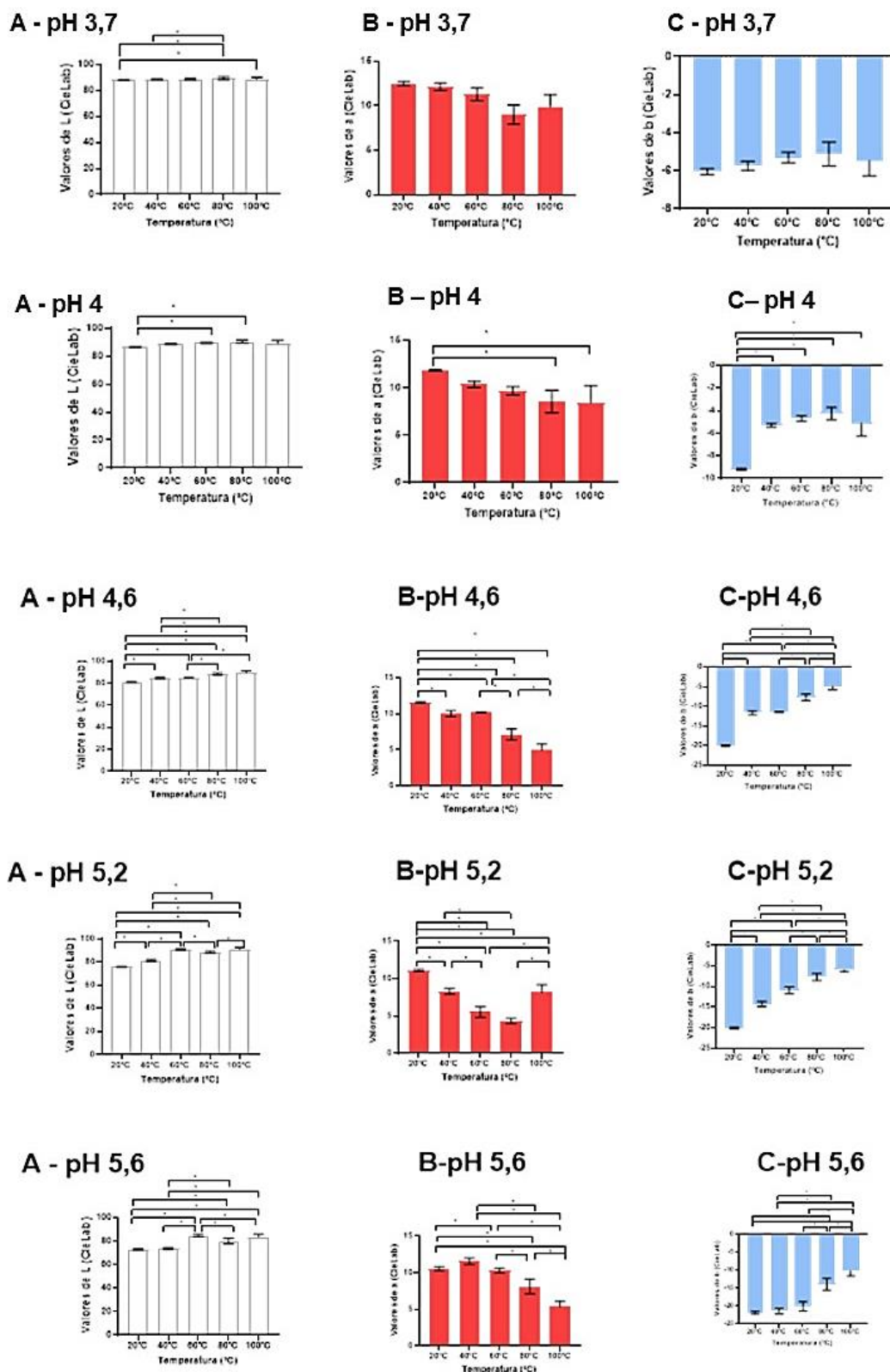
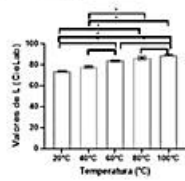
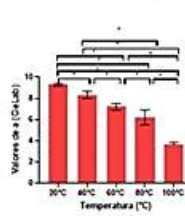


Figura 38. Valores de L* (A), a* (B) e b* (C) dos complexos de Antocianina + Alumínio com G.A. 0.7% a pH 3,7, 4, 4,6, 5,2 e 5,6 com o aumento de temperatura (20°C-100°C).

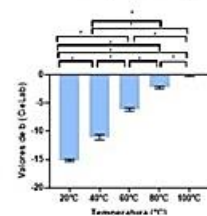
A - pH 3,7



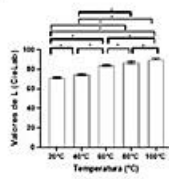
B-pH 3,7



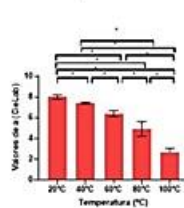
C-pH 3,7



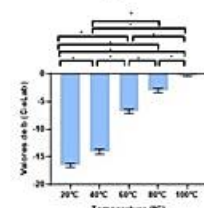
A - pH 4



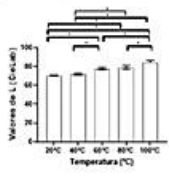
B-pH 4



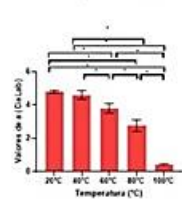
C-pH 4



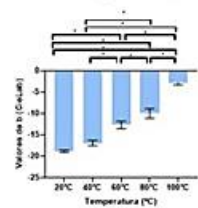
A - pH 4,6



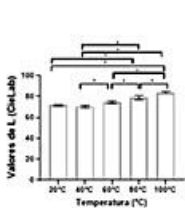
B-pH 4,6



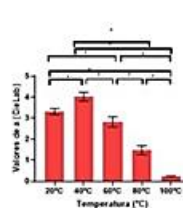
C-pH 4,6



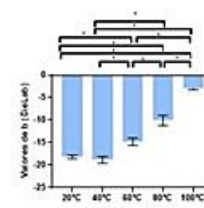
A - pH 5,2



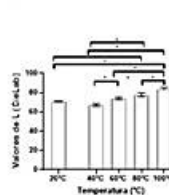
B-pH 5,2



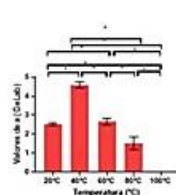
C-pH 5,2



A - pH 5,6



B-pH 5,6



C-pH 5,6

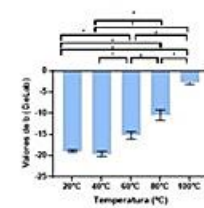


Figura 39. Valores de L* (A), a* (B) e b* (C) dos complexos de Antocianina + Ferro com G.A. 0.7% a pH 3.7, 4, 4.6, 5.2 e 5.6 com o aumento de temperatura (20°C-100°C).

Uma vez que a percepção de cor é o resultado de três parâmetros (L^* , a^* e b^*) é difícil interpretar os valores de forma independente. Desta forma, para descrever de uma melhor forma a variação de cor, utilizou-se o cálculo da Diferença Total de Cor (TCD), visto que é a combinação destes três parâmetros como é possível observar na **Tabela 16** e **Tabela 17**. A diferença total de cor foi obtida para cada complexo às diferentes temperaturas em relação aos complexos formados à temperatura ambiente (20°C).

Tabela 16. Valores de Diferença Total de Cor (TCD) para as diferentes temperaturas e valores de pH nos complexos Antocianina-Alumínio.

	3,7	4	4,6	5,2	5,6
40°C	6,1 ± 0,7	3,8 ± 0,2	2,5 ± 0,7	1,4 ± 0,2	4,4 ± 0,3
60°C	13,7 ± 0,4	15,9 ± 0,3	9,7 ± 0,2	4,6 ± 0,2	4,8 ± 0,6
80°C	18,4 ± 0,4	20,9 ± 0,1	12,6 ± 0,5	11,1 ± 0,5	10,9 ± 0,2
100°C	22,2 ± 0,3	25,2 ± 0,1	21,8 ± 0,3	19,55 ± 0,06	20,4 ± 0,3

Tabela 17. Valores de Diferença Total de Cor (TCD) para as diferentes temperaturas e valores de pH nos complexos Antocianina-Ferro.

	3,7	4	4,6	5,2	5,6
40°C	6,2 ± 0,1	3,6 ± 0,2	3,0 ± 0,2	1,5 ± 0,1	4,4 ± 0,2
60°C	13,9 ± 0,4	15,9 ± 0,4	9,7 ± 0,2	4,723 ± 0,2	4,68 ± 0,05
80°C	17,9 ± 0,5	20,7 ± 0,2	12,6 ± 0,5	10,51 ± 0,05	10,6 ± 0,2
100°C	22,6 ± 0,3	24,9 ± 0,3	22,0 ± 0,4	19,9 ± 0,2	20,4 ± 0,3

Os resultados sugerem que a maior diminuição da cor visual foi mais rápida a partir dos 60°C em todos os pHs, e mais baixa nas temperaturas de 40°C. O resultado obtido com a relação destes três parâmetros está de acordo com os resultados obtidos

com a análise dos parâmetros colorimétricos individualmente. Ambos os complexos apresentam gradualmente um aumento da diferença total de cor, podendo ser explicado pelo deslocamento do equilíbrio antociânico e aumento percentagem de espécies incolores da antocianina na solução que são menos estáveis ao aumento da temperatura.

As variações nos valores de TCD poderiam ser utilizados para prever a degradação durante o processamento térmico de antocianinas em produtos que utilizam como matéria-prima os frutos vermelhos. A vantagem do uso de cor visual é que ela pode ser medida como um parâmetro de qualidade instantânea, não sendo necessário fazer medição por espectrofotometria. Uma abordagem semelhante foi feita por Ahmed et al. (2004), em puré de ameixa, e por Shao-Qian et al. (2011) em sumo de laranja, demonstrando a degradação de cor visual ao longo da variação de tempo ou temperatura.

3.4.3. Liofilização dos complexos antocianina-metal

Para analisar a manutenção de cor dos complexos sob a formulação de pó, foi analisada a diferença de cor de cada parâmetro L^* , a^* e b^* e diferença total de cor de forma a analisar qual dos complexos variava mais a sua cor como um todo e se havia uma relação com o pH. O ΔL , Δa e Δb foram calculados em relação aos complexos formados durante as 0h.

Tabela 18. Valores de ΔL , Δa , Δb e TDC para os complexos Antocianina-Alumínio ressuspensos em relação aos complexos iniciais a diferentes pHs.

Amostra	ΔL	Δa	Δb	TDC
Al+Ant+GA 0,7% 3,7	$-11,0 \pm 0,2$	$9,9 \pm 0,1$	$-12,5 \pm 0,1$	$19,3 \pm 0,3$
Al+Ant+GA 0,7% 4	$-15,8 \pm 0,1$	$-3,93 \pm 0,01$	$-11,28 \pm 0,05$	$19,8 \pm 0,1$
Al+Ant+GA 0,7% 4,6	$-9,6 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,2$	$-7,5 \pm 0,2$	$12,3 \pm 0,4$
Al+Ant+GA 0,7% 5,2	$-2,8 \pm 0,2$	$-0,0 \pm 0,2$	$-1,4 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,4$
Al+Ant+GA 0,7% 5,6	$0,1 \pm 0,2$	$-0,3 \pm 0,4$	$0,46 \pm 0,02$	$1,1 \pm 0,1$

Tabela 19. Valores de ΔL , Δa , Δb e TDC para os complexos Antocianina-Ferro ressuspensos em relação aos complexos iniciais a diferentes pHs.

Amostra	ΔL	Δa	Δb	TDC
Fe+Ant+GA 0,7% 3,7	$6,7 \pm 0,4$	$-5,13 \pm 0,09$	$-4,67 \pm 0,01$	$9,7 \pm 0,2$
Fe+Ant+GA 0,7% 4	$-3,69 \pm 0,06$	$-3,9 \pm 0,3$	$-3,3 \pm 0,2$	$6,3 \pm 0,3$
Fe+Ant+GA 0,7% 4,6	$-3,7 \pm 0,4$	$-3,88 \pm 0,06$	$-3,3 \pm 0,3$	$4,9 \pm 0,1$
Fe+Ant+GA 0,7% 5,2	$1,6 \pm 0,3$	$-0,1 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,5$	$2,145 \pm 0,3$
Fe+Ant+GA 0,7% 5,6	$0,42 \pm 0,08$	$-2,51 \pm 0,08$	$1,61 \pm 0,08$	$3,011 \pm 0,1$

Como é possível observar na **Tabela 18** e na **Tabela 19**, os resultados sugerem que a maior Diferença Total de Cor (TDC) foi observada em pHs inferiores e foi diminuindo com o aumento de pH em ambos os metais. Apesar da cor roxa ter permanecido, os complexos tornaram-se mais escuros (diminuição de L^*) nos valores de pH mais baixos, tanto nos complexos de alumínio como nos complexos de ferro. Isto pode ser explicado por a estes pHs haver mais base quinoidal que complexou com os metais e por isso ter mantido mais a cor do complexo num todo.

Com os resultados obtido é possível concluir que apesar de ambos os complexos manterem a tonalidade arroxeada, não é possível garantir a cor inicial dos complexos, uma vez que houve alteração de cor.

3.4.3.1. Medição dos valores de pH

As medições dos valores dos pHs dos complexos de alumínio e ferro com cianidina-3-glucósido após a sua ressuspensão foram feitas com o objetivo de ver se os mesmos manteriam os valores de pH estáveis a que tinham sido sintetizados.

Os resultados evidenciaram um aumento de cerca de um valor em ambos os metais (**Tabela 20** e **Tabela 21**).

Tabela 20. Valores do pH dos tampões dos complexos de Antocianina-Alumínio antes e após serem liofilizados e ressuspendidos.

pH do Tampão Acetato	pH inicial do complexo	pH do complexo ressuspendido
3,7	3,65	5,01
4	4,09	5,46
4,6	4,42	6,30
5,2	5,01	6,54
5,6	5,40	6,82

Tabela 21. Valores do pH dos tampões dos complexos de Antocianina-Ferro antes e após serem liofilizados e ressuspensos.

pH do Tampão Acetato	pH inicial do complexo	pH do complexo ressuspensionado
3,7	3,65	5,76
4	4,06	5,58
4,6	4,58	6,0
5,2	5,19	6,30
5,6	5,56	6,42

Os resultados obtidos podem ser explicados pelo facto do tampão usado como solvente dos complexos ser constituído por acetato de sódio e com ácido acético. Após serem liofilizados, os sais residuais do tampão foram eventualmente do acetato de sódio que juntamente com a água (solvente usado para ressuspender o complexo) com o pH neutro, fez aumentar o pH dos complexos, até um valor mais próximo do pH neutro. Desta forma é possível observar que os complexos não mantêm o pH a que foram sintetizados após a sua ressuspensão.

3.5. Atividade Anti-microbiana dos Complexos Metal-Antociânicos

Com o objetivo de estudar a atividade anti-microbiana dos complexos realizou-se o mesmo protocolo utilizado para extratos vegetais tendo por base a absorvância e as curvas de crescimento de cada estirpe para calcular as percentagens de cada bactéria escolhida. Foram escolhidas duas bactérias de espécies diferentes, *E.coli* uma Gram (-) e *S. aureus* uma Gram (+).

Os resultados da atividade antimicrobiana dos complexos Antocianina-Alumínio e Ferro-Alumínio podem ser observados na **Figura 22** e **Figura 23**. Em relação ao crescimento de *E.coli* é possível observar uma maior inibição nos complexos de Alumínio a uma concentração de 10 mg/mL em relação aos complexos de Ferro com a mesma concentração, no entanto a percentagem de crescimento é muito elevada. Em relação aos complexos com uma concentração de 1 mg/mL o crescimento foi aproximadamente de 100% para a bactéria, quase igualando a percentagem de crescimento ao controlo negativo o que leva a concluir que não houve atividade a esta

concentração. No que diz respeito à atividade dos complexos em *S.aureus*, a percentagem de crescimento foi de aproximadamente 75% em ambos os complexos com concentração 10 mg/mL aproximadamente 96% com 1 mg/mL. Os resultados com os complexos são muito semelhantes entre os diferentes metais e as diferentes bactérias não sendo possível tirar nenhuma conclusão em relação ao potencial tóxico dos mesmos em cada uma das bactérias. Genskowsky et al. (2016) procurou estudar a atividade antimicrobiana de antocianinas em algumas bactérias responsáveis por intoxicações e infeções alimentares tendo concluído que estes compostos fenólicos apresentaram toxicidade para os microrganismos em estudo. As antocianinas e os compostos fenólicos revelaram permeabilidade da membrana através do rearranjo da membrana de lipopolissacáridos e do aumento do efluxo de ATP do citoplasma. Também foi sugerido por Kleerbezen et al. (2010) que compostos fenólicos extraídos de mirtilos evidenciaram efeitos na fluidez da membrana dos microrganismos em estudo alterando a estrutura dos ácidos gordos interrompendo o metabolismo das células. No entanto, a baixa concentração destes compostos no complexo em relação à usada por Genskowsky et al. (2016) pode estar na origem da reduzida atividade evidenciada nos ensaios.

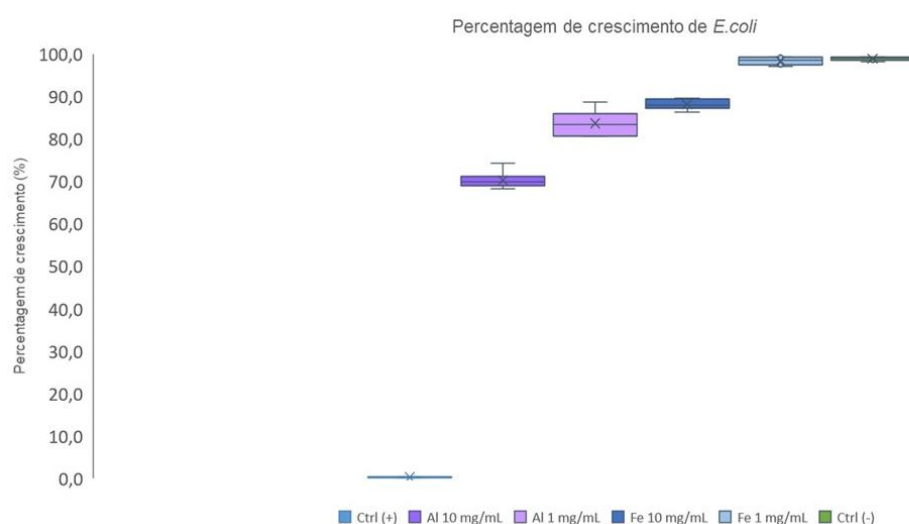


Figura 40. Percentagem de crescimento de *E.coli* com diferentes concentrações dos complexos Antocianina+Alumínio e Antocianina+Ferro.



Figura 41. Percentagem de crescimento de *S. aureus* com diferentes concentrações dos complexos Antocianina+Alumínio e Antocianina+Ferro.

3.6. Atividade Anti-microbiana da *Chrozophora tinctoria*

Uma vez que os complexos não evidenciaram nenhuma atividade anti-microbiana, procurou-se analisar outra alternativa corante com a cor azul que pudesse ter esta propriedade de interesse para futuro uso em matriz alimentar.

Os resultados dos ensaios anti-microbianos com a *Chrozophora tinctoria* foram obtidos com a realização duas réplicas para poder validar os resultados obtidos. Os resultados obtidos podem ser observados na **Figura 24 e Figura 25**. Estes ensaios evidenciaram uma Atividade anti-microbiana significativa para *E. coli* e *S. aureus*. Para a *E.coli* o extrato apresentou uma atividade inibitória de crescimento de 35% e para *S. aureus* de 75%.

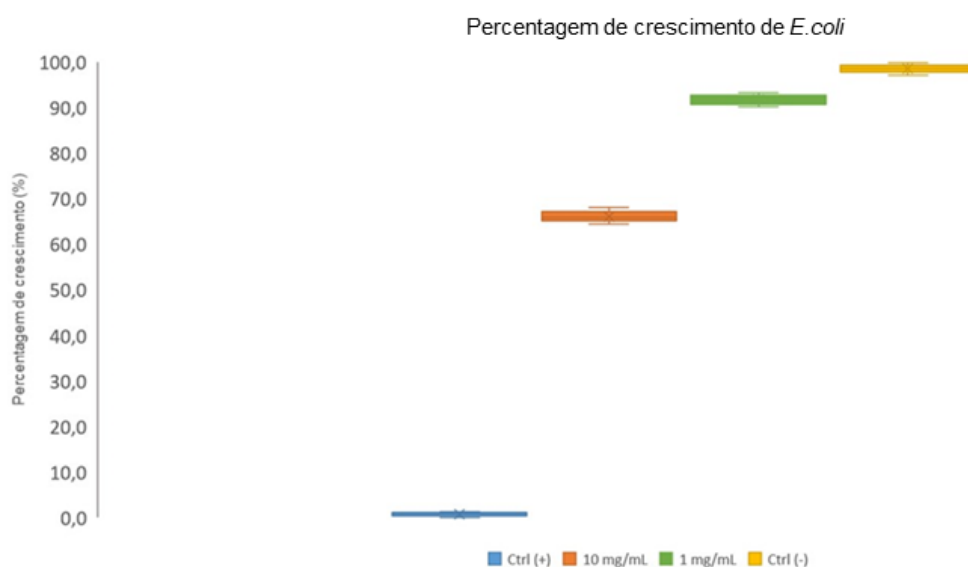


Figura 42. Percentagem de crescimento de *E. coli* com diferentes concentrações de extrato de *Chrozophora tinctoria*.

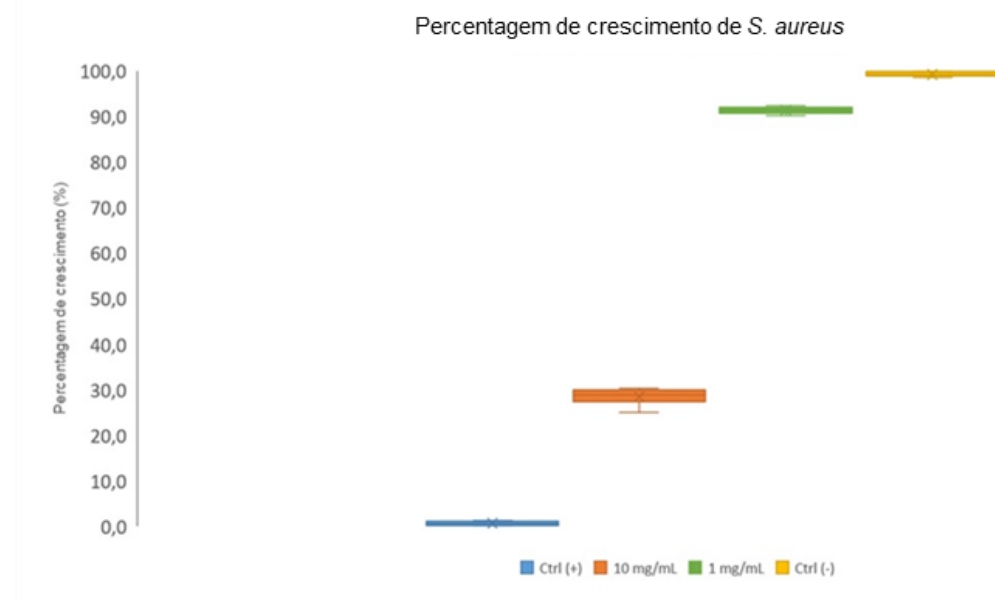


Figura 43. Percentagem de crescimento de *S. aureus* com diferentes concentrações de extrato de *Chrozophora tinctoria*.

A *Chrozophora tinctoria* cujos frutos têm sido usados durante milhares de anos como corantes naturais produzem uma tinta com alguns compostos que foram recentemente descritos por Nabais et al. (2020). Além disso, existem registos da *C. tinctoria* ser usada como um emético e no tratamento de verrugas (Ugurlu & Secmen, 2008; Viegi et al., 2003). Adicionalmente, estudos científicos confirmam atividade anti-inflamatória nos flavonoides presentes na planta (Abdallah et al., 2015). Oke-Altuntas et al. (2017), evidenciou que extratos com acetato de etilo eram ricos em fenóis com atividades antioxidantes e antiproliferativas com ácido gálgico exibindo capacidades altas antiproliferativas e de eliminação de radicais. Além disso Golkar et al. (2019) também evidenciou que extratos metanólicos de folhas de *C. tinctoria* possuem atividade antioxidante e antimicrobiana na presença de compostos fenólicos, apontando a possibilidade de *C. tinctoria* como um nutracêutico. Dastagir et al. (2012) evidenciou que extratos com hexano e metanol de folhas de *C. tinctoria* apresentaram alguma atividade antimicrobiana. Curiosamente, enquanto extratos metanólicos evidenciaram quase nenhuma atividade inibitória contra *S. aureus*, extratos de hexano revelaram uma atividade substancial contra esta bactéria. Estes resultados, estão assim congruentes com as observações nos ensaios antimicrobianos realizados, onde o extrato de frutos de *C. tinctoria*, evidenciaram uma elevada atividade contra *S. aureus*, mas mais baixa contra *E.coli*.

Conclusões

Os alimentos com ingredientes mais funcionais e naturais têm cada vez mais sido procurados pelo consumidor e têm tido consequentemente uma maior atenção por parte da indústria alimentar. Desta forma existe um grande interesse em desenvolver formulações para aditivos que confirmem ao alimento os parâmetros pretendidos, sendo a cor um deles, mas que simultaneamente possuam características de interesse. Neste sentido as antocianinas e a *Chrozophora tinctoria* constituem uma alternativa com enorme potencial como corantes azuis, tanto pelas suas características nutracêuticas no caso das antocianinas como pelas propriedades medicinais que podem ter aplicações alimentares da *Chrozophora*.

Assim sendo, numa primeira parte deste trabalho obteve-se um extrato rico em Cianidina-3-glucósido com a finalidade de sintetizar um complexo com metais, estável e que apresentasse cores atrativas de interesse face à pouca oferta no mercado. De uma forma geral os complexos evidenciaram precipitação com o aumento do pH o que reforçou a falta de estabilidade observada a olho nu. Foi adicionado um agente emulsionante/gelificante de forma a observar se evitaria a precipitação, o que se verificou.

Deste modo foram analisadas as coordenadas colorimétricas dos complexos sujeitos a diversas condições nomeadamente liofilização, degradação térmica e também foi analisada a estabilidade de complexos sintetizados com extrato bruto. Relativamente aos complexos sujeitos aos diferentes ensaios, o pH inferior evidenciou uma maior estabilidade à degradação térmica e uma menor diferença de cor em relação aos complexos que serviram de referência (menores diferenças das coordenadas colorimétricas). No entanto é importante referir que apesar dos resultados das coordenadas colorimétricas, que tem por base a captação de cor pelo olho humano,

não revelarem diferenças foi possível verificar uma alteração de cor do complexo sintetizado com ferro ao pH inferior, por espectrofotometria.

Foram também realizados ensaios de estudo de potencial antimicrobiano dos complexos sintetizados com ambos os metais, o mesmo não se tendo verificado uma vez que a percentagem de inibição foi de aproximadamente 25% para cada bactéria em estudo.

Foram também realizados ensaios com outra alternativa de grande interesse, a *Chrozophora tinctoria*. Foi primeiramente obtido um extrato obtido de frutos da planta, que foi posteriormente liofilizado. O potencial antimicrobiano do extrato obtido foi analisado para duas bactérias responsáveis por infeções e intoxicações alimentares, *E.coli* e *S.aureus*. A *C. tinctoria* para além de apresentar uma cor atrativa, apresentou também uma elevada atividade antimicrobiana para *S.aureus* (75%), o que a torna um ingrediente funcional para ser introduzido numa matriz alimentar.

Relativamente a perspetivas futuras relativamente aos complexos metal-antocianina, existem várias vertentes a explorar no âmbito deste trabalho. Diferentes rácios antocianina:metal podem ser exploradas de forma a perceber qual o melhor rácio em termos de estabilidade e cor final. Também outras concentrações de goma arábica poderão ser testadas em ensaios futuros ou outros polissacáridos de forma a elaborar um estudo aprofundado de qual polímero que apresenta um melhor comportamento na estabilização dos complexos. Em relação ao extrato bruto, uma vez que apresentou complexação com os metais deveria ser analisado em concentrações superiores de forma a perceber qual a concentração de extrato bruto que se aproximaria mais da cor original dos complexos ou de uma cor de interesse. Realização de ensaios de DLS (Dynamic Light Scattering) de forma a caracterizar os complexos quanto à dimensão das suas partículas e comportamento das mesmas ao longo do tempo. Relativamente à *C. tinctoria*, as perspetivas futuras passam por tentar identificar o composto bioativo responsável pela atividade antimicrobiana evidenciada neste trabalho e analisar se o mesmo se verifica noutras espécies de microorganismos.

A realização de outros estudos permite um conhecimento aprofundado acerca das antocianinas e da sua resposta a determinados fatores. Este elevado número de estudos envolvendo estes pigmentos permitirá avaliar condições para serem desenvolvidas novas alternativas aos corantes alimentares existentes com este

composto na sua constituição. A perspectiva de novos aditivos alimentares que reúnam várias propriedades e que as confirmem à matriz onde estão inseridos, possui um grande potencial, uma vez que possivelmente diminuiria a quantidade total dos aditivos nos alimentos. Em contraste existem poucos estudos relativamente à *Chrozophora tinctoria*, no entanto representa uma alternativa viável para substituir os corantes azuis, devido ao seu uso alimentar documentado. Apesar do reduzido número de estudos envolvendo a planta, é importante continuar a desenvolver este tipo de trabalhos no sentido de alargar o conhecimento da mesma, no âmbito de aplicações na indústria alimentares atual.

Bibliografia

- Abdallah, H. M., Almowallad, F. M., Esmat, A., Shehata, I. A., & Abdel-Sattar, E. A. (2015). Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Chrozophora tinctoria*. *Phytochemistry Letters*, 13, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.05.008>
- Aceto, M., Arrais, A., Marsano, F., Agostino, A., Fenoglio, G., Idone, A., & Gulmini, M. (2015). A diagnostic study on folium and orchil dyes with non-invasive and micro-destructive methods. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 142, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.02.001>
- Adams JB. (1973.) Thermal degradation of anthocyanins wiwth particular reference to the 3- glycosides of cyanidin. I. In acidified aqueous solution at 100.deg. *J Sci Food Agric* 24: 747-762.
- Ahmed, J., Shivhare, U. S., & Raghavan, G. S. V. (2004). Thermal degradation kinetics of anthocyanin and visual colour of plum puree. *European Food Research and Technology*, 218(6), 525-528. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-0906-5>
- Amchova, P., Kotolova, H., & Ruda-Kucerova, J. (2015). Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(3), 914–922. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.026>
- Aslamkhan, A. M. Y. G., Aslamkhan, A., & Ahearn, G. A. (2002). Preparation of Metal Ion Buffers for Biological Experimentation : A Methods Approach With Emphasis on Iron and Zinc. *Journal of Experimental Zoology*, 292(6), 507–522. <https://doi.org/10.1002/jez.10068>
- Aung, M. M., & Chang, Y. S. (2014). Traceability in a food supply chain : Safety and quality perspectives. *Food Control*, 39, 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.007>

- Başlar, S. (2000). An investigation on *Chrozophora tinctoria* (L.) Rafin. Distributed in West Anatolia. *Turkish Journal of Botany*, 24(2), 103–112.
- Bearth, A., Cousin, M. E., & Siegrist, M. (2014). The consumer's perception of artificial food additives: Influences on acceptance, risk and benefit perceptions. *Food Quality and Preference*, 38, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2014.05.008>
- Behling, E. V., SENDÃO, M. C., FRANCESCATO, H. D. C., ANTUNES, L. M. G., & Bianchi, M. D. L. (2008). Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 15(3), 285-292.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 67–87.
- Bowen-Forbes, C. S., Zhang, Y., & Nair, M. G. (2010). Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 554–560. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.08.012>
- Buchweitz, M., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2012). Bathochromic and stabilising effects of sugar beet pectin and an isolated pectic fraction on anthocyanins exhibiting pyrogallol and catechol moieties. *Food Chemistry*, 135(4), 3010–3019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.101>
- Buchweitz, M., Nagel, A., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2012a). Characterisation of sugar beet pectin fractions providing enhanced stability of anthocyanin-based natural blue food colourants. *Food Chemistry*, 132(4), 1971–1979. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.034>
- Buchweitz, M., Brauch, J., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2013). Application of ferric anthocyanin chelates as natural blue food colorants in polysaccharide and gelatin based gels. *FRIN*, 51(1), 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.030>
- Buckow, R., Kastell, A., Terefe, N. S., & Versteeg, C. (2010). Pressure and temperature effects on degradation kinetics and storage stability of total anthocyanins in blueberry juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10076–10084. <https://doi.org/10.1021/jf1015347>
- Bueno, J. M., Sáez-Plaza, P., Ramos-Escudero, F., Jiménez, A. M., Fett, R., & Asuero,

- A. G. (2012). Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part II: Chemical Structure, Color, and Intake of Anthocyanins. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42(2), 126–151. <https://doi.org/10.1080/10408347.2011.632314>
- Cardello, A. V. (1994). Consumer expectations and their role in food acceptance. *Measurement of Food Preferences*, 253–297. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2171-6_10
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 377–399. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12065>
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. de L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.007>
- Chaitanya Lakshmi G. (2014). Food Coloring: The Natural Way. *Research Journal of Chemical Sciences*, 4(2), 87–96.
- Chung, C., Rojanasasithara, T., Mutilangi, W., & McClements, D. J. (2016). Enhancement of colour stability of anthocyanins in model beverages by gum arabic addition. *Food Chemistry*, 201, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.051>
- Coppo, E., & Marchese, A. (2014). Antibacterial activity of polyphenols. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 15(4), 380–390.
- Cortez, R., Luna-Vital, D. A., Margulis, D., & Gonzalez de Mejia, E. (2017). Natural Pigments: Stabilization Methods of Anthocyanins for Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 180–198. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12244>

- Costell, E., Tárrega, A., & Bayarri, S. (2010). Food acceptance: the role of consumer perception and attitudes. *Chemosensory perception*, 3(1), 42-50. <https://doi.org/10.1007/s12078-009-9057-1>
- Cruz, L., Basílio, N., & de Freitas, V. (2020). Color stabilization of cyanidin-3-glucoside-based dyes by encapsulation with biocompatible PEGylated phospholipid micelles. *Dyes and Pigments*, 181, 108592. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108592>
- Cruz, L., Basílio, N., Mateus, N., Pina, F., & De Freitas, V. (2015). Characterization of kinetic and thermodynamic parameters of cyanidin-3-glucoside methyl and glucuronyl metabolite conjugates. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(5), 2010–2018. <https://doi.org/10.1021/jp511537e>
- Dabas, D. (2016). Polyphenols as colorants. *Adv. Food Technol. Nutr. Sci. Open J*, 2, 1-6. <https://doi.org/10.17140/AFTNSOJ-SE-2-101>
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>
- Dao, L. T., Takeoka, G. R., Edwards, R. H., & Berrios, J. D. J. (1998). Improved Method for the Stabilization of Anthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3564–3569. <https://doi.org/10.1021/jf980359v>
- Dastagir, G., Hussain, F., & Khan, A. A. (2012). Antibacterial activity of some selected plants of family Zygophyllaceae and Euphorbiaceae. *Journal of medicinal plants research*, 6(40), 5360-5368.
- Delazar, A., Talischi, B., Nazemiyeh, H., Rezazadeh, H., Nahar, L., & Sarker, S. D. (2006). Chrozophorin: a new acylated flavone glucoside from Chrozophora tinctoria (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(3), 286–290. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2006000300002>
- Delwiche, J. (2004). The impact of perceptual interactions on perceived flavor. *Food Quality and Preference*, 15(2), 137–146. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(03\)00041-7](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(03)00041-7)
- Dudarić, L., Fužinac-Smojver, A., Muhvić, D., & Giacometti, J. (2015). The role of polyphenols on bone metabolism in osteoporosis. *Food Research International*,

77, 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.10.017>

Escribano-Bailon, M. T. & Santos-Buelga, C. (2012). Anthocyanin copigmentation-evaluation, mechanisms and implications for the colour of red wines. *Current Organic Chemistry*, 16(6), 715-723. <https://doi.org/10.2174/138527212799957977>

Feingold, B. F. (1975). Hyperkinesis and learning disabilities linked to artificial food flavors and colors. *The American Journal of Nursing*, 75(5), 797–803. <https://doi.org/10.2307/3423460>

Fernandes, I., Freitas, V. De, & Mateus, N. (2014). Anthocyanins and human health : How gastric absorption may influence acute human physiology. *Nutrition and Aging*, 2(1), 1–14. <https://doi.org/10.3233/NUA-130030>

Ferrera, T. S., Heldwein, A. B., Dos Santos, C. O., Somavilla, J. C., & Sautter, C. K. (2016). Substâncias fenólicas , flavonoides e capacidade antioxidante em erva-mate sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 18(2), 588–596.

Francis, F. J. (1995). Quality as influenced by color. *Food Quality and Preference*, 6(3), 149–155. [https://doi.org/10.1016/0950-3293\(94\)00026-R](https://doi.org/10.1016/0950-3293(94)00026-R)

Galaffu, N., Bortlik, K., & Michel, M. (2015). An industry perspective on natural food colour stability. In *Colour Additives for Foods and Beverages*, 91-130. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-011-8.00005-2>

García-Viguera, C., Zafrilla, P., Artés, F., Romero, F., Abellán, P., & Tomás-Barberán, F. A. (1998). Colour and anthocyanin stability of red raspberry jam. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78(4), 565–573. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199812\)78:4<565::AID-JSFA154>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199812)78:4<565::AID-JSFA154>3.0.CO;2-P)

Genskowsky, E., Puente, L. A., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J., Muñoz, L. A., & Viuda-Martos, M. (2016). Determination of polyphenolic profile, antioxidant activity and antibacterial properties of maqui [*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz] a Chilean blackberry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(12), 4235-4242. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7628>

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. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00221-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00221-8)
- Golkar, P., Taghizadeh, M., & Jalali, S. A. H. (2019). Determination of phenolic compounds, antioxidant and anticancer activity of *Chrozophora tinctoria* accessions collected from different regions of Iran. *Journal of Food Biochemistry*, 43(11), 1–14. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13036>
- Goto, T., & Kondo, T. (1991). Structure and molecular stacking of anthocyanins—flower color variation. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 30(1), 17-33.
- Grujić, Slavica; Grujić, Radoslav; Petrović, Đorđe; Gajić, J. (2013). Knowledge of food quality and additives and its impact on food preference. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 12(2), 215–222.
- Guan, Y., & Zhong, Q. (2014). Gum arabic and Fe²⁺ synergistically improve the heat and acid stability of norbixin at pH 3.0–5.0. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(52), 12668-12677.
- Guimarães, M., Mateus, N., De Freitas, V., & Cruz, L. (2018). Improvement of the Color Stability of Cyanidin-3-glucoside by Fatty Acid Enzymatic Acylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(38), 10003–10010. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03536>
- Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(9), 950–988.
- He, J., & Giusti, M. M. (2010). Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual review of food science and technology*, 1, 163-187. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100754>
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572–584.
- Janiszewska-Turak, E., Pisarska, A., & Królczyk, J. B. (2016). Natural food pigments application in food products. *Nauka Przyroda Technologie*, 10(4).
- Jespersen, L., Strømdahl, L. D., Olsen, K., & Skibsted, L. H. (2005). Heat and light

- stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. *European Food Research and Technology*, 220(3), 261-266. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1062-7>
- Jurić, S., Jurić, M., Król-Kilińska, Ż., Vlahoviček-Kahlina, K., Vinceković, M., Dragović-Uzelac, V., & Donsì, F. (2020). Sources, stability, encapsulation and application of natural pigments in foods. *Food Reviews International*, 1–56. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1837862>
- Kleerebezem, M., Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., Zhou, M., Siezen, R. J., & Bron, P. A. (2010). The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS microbiology reviews*, 34(2), 199-230. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00208.x
- Krga, I., & Milenkovic, D. (2019). Anthocyanins : From Sources and Bioavailability to Cardiovascular- Health Bene fi ts and Molecular Mechanisms of Action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(7), 1771–1783. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06737>
- Liu, J., Du, C., Beaman, H. T., & Monroe, M. B. B. (2020). Characterization of Phenolic Acid Antimicrobial and Antioxidant Structure – Property Relationships. *Pharmaceutics*, 12(5), 419.
- Malien-Aubert, C., Dangles, O., & Amiot, M. J. (2001). Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 170–176. <https://doi.org/10.1021/jf000791o>
- Markakis P, Livingston GE, Fellers CR. (1957). Quantitative aspects of strawberry-pigment degradation. *Food Research* 22: 117-130
- Markakis P. (1982). Stability of anthocyanins in foods. In: Anthocyanins as Food Colors. Markakis P (ed.), *Academic Press Inc., New York*, p.163-178.
- Mateus, N., & Freitas, V. De. (2008). Anthocyanins as Food Colorants. *Anthocyanins*, 284–304. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-77335-3>
- Maurya, H. (2018). An Updates on Chrozophora Tinctoria for Its Medicinal Values Harikesh. *Journal Current Pharma Research*, 9(1), 2589–2603.

- Mccann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., Kitchin, E., Lok, K., Porteous, L., Prince, E., Sonuga-barke, E., Warner, J. O., & Stevenson, J. (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8 / 9-year-old children in the community: a randomised , double-blinded , placebo-controlled trial. *The Lancet*, 370(9598), 1560–1567. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61306-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61306-3)
- McClements, D. J. (2015). Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 219, 27–53. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.02.002>
- McDonald, M., Mila, I., & Scalbert, A. (1996). Precipitation of metal ions by plant polyphenols: optimal conditions and origin of precipitation. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 44(2), 599-606.
- Moncada, M. C., Moura, S., Melo, M. J., Roque, A., Lodeiro, C., & Pina, F. (2003). Complexation of aluminum(III) by anthocyanins and synthetic flavylum salts: A source for blue and purple color. *Inorganica Chimica Acta*, 356, 51–61. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(03\)00394-3](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(03)00394-3)
- Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, 83, 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.09.036>
- Neves, M. I. L., Silva, E. K., & Meireles, M. A. A. (2021). Natural blue food colorants: Consumer acceptance, current alternatives, trends, challenges, and future strategies. *Trends in Food Science & Technology*, 112, 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.023>
- Nabais, P., Oliveira, J., Pina, F., Teixeira, N., De Freitas, V., Brás, N. F., Clemente, A., Rangel, M., Silva, A. M. S., & Melo, M. J. (2020). A 1000-year-old mystery solved: Unlocking the molecular structure for the medieval blue from *Chrozophora tinctoria*, also known as folium. *Science Advances*, 6(16), 1–9. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz7772>

- Newsome, A. G., Culver, C. A., & Van Breemen, R. B. (2014). Nature's palette: the search for natural blue colorants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6498-6511.
- Okafor, S. N., Obonga, W., Ezeokonkwo, M. A., Nurudeen, J., Orovwigho, U., & Ahiabuike, J. (2016). Assessment of the health implications of synthetic and natural food Colourants—A critical review. *Pharmaceutical and Biosciences Journal*, 4(4), 1-11.
- Oke-Altuntas, F., Ipekcioglu, S., Yaglioglu, A. S., Behcet, L., & Demirtas, I. (2017). Phytochemical analysis, antiproliferative and antioxidant activities of *Chrozophora tinctoria*: a natural dye plant. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 966–973. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1277767>
- Panteloglou, A. G., Bell, A. E., & Ma, F. (2010). Effect of high-hydrostatic pressure and pH on the rheological properties of gum arabic. *Food Chemistry*, 122(4), 972–979. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.037>
- Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science and Technology*, 21(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.004>
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2013). Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological Research*, 68(1), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.018>
- Roda-serrat, M. C., Christensen, K. V., El-houri, R. B., Fretté, X., & Christensen, L. P. (2018). Fast cleavage of phycocyanobilin from phycocyanin for use in food colouring. *Food Chemistry*, 240, 655–661. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.149>
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990–5999. <https://doi.org/10.1039/c3ay41125g>
- Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 215-217.

- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005a). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287-306. <https://doi.org/10.1080/1040869059096>
- Scotter, M. J. (2011). Emerging and persistent issues with artificial food colours: natural colour additives as alternatives to synthetic colours in food and drink. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 3(1), 28-39. <https://doi.org/10.1111/j.1757-837X.2010.00087.x>
- Skrede, G., Wrolstad, R. E., Lea, P., & Enersen, G. (1992). Color stability of strawberry and black currant syrups. *Journal of Food Science*, 57 (1), 172-177.
- Shoji, T. (2007). Polyphenols as Natural Food Pigments: Changes During Food Processing. *American Journal of Food Technology*, 2(7), 570-581. <https://doi.org/10.3923/ajft.2007.570.581>
- Siegrist, M., & Sütterlin, B. (2017). Importance of perceived naturalness for acceptance of food additives and cultured meat. *Appetite*, 113, 320-326. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.03.019>
- Sigurdson, G. T., Robbins, R. J., Collins, T. M., & Giusti, M. M. (2016). Evaluating the role of metal ions in the bathochromic and hyperchromic responses of cyanidin derivatives in acidic and alkaline pH. *Food Chemistry*, 208, 26-34. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.109>
- Sigurdson, G. T., Robbins, R. J., Collins, T. M., & Giusti, M. M. (2017). Spectral and colorimetric characteristics of metal chelates of acylated cyanidin derivatives. *Food Chemistry*, 221, 1088-1095. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.052>
- Silva, V. O., Freitas, A. A., Maçanita, A. L., & Quina, F. H. (2016). Chemistry and photochemistry of natural plant pigments: the anthocyanins. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 29(11), 594-599. <https://doi.org/10.1002/poc.3534>
- Silveira, A. C., Dias, J. P., Santos, V. M., Oliveira, P. F., Alves, M. G., Rato, L., & Silva, B. M. (2018). The Action of Polyphenols in Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: A Common Agent for Overlapping Pathologies. *Current Neuropharmacology*, 17(7), 590-613. <https://doi.org/10.2174/1570159x16666180803162059>

- Skrede, G., Weolstad, R. E., LEA, P., & ENERSEN, G. (1992). Color Stability of Strawberry and Blackcurrant Syrups. *Journal of Food Science*, 57(1), 172–177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05449.x>
- Soares, S. E. (2002). Phenolic acids as antioxidants. *Revista de Nutrição*, 15(1), 71-81.
- Solymosi, K., Latruffe, N., Morant-Manceau, A., & Schoefs, B. (2015). Food colour additives of natural origin. In *Colour additives for foods and beverages* (pp. 3-34). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-011-8.00001-5>
- Sousa, A., Cabrita, L., Araújo, P., Mateus, N., Pina, F., & De Freitas, V. (2014). Color stability and spectroscopic properties of deoxyvitisins in aqueous solution. *New Journal of Chemistry*, 38(2), 539–544. <https://doi.org/10.1039/c3nj01271a>
- Stintzing, F. C., Stintzing, A. S., Carle, R., Frei, B., & Wrolstad, R. E. (2002). Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6172–6181. <https://doi.org/10.1021/jf0204811>
- Sui, X., Dong, X., & Zhou, W. (2014). Combined effect of pH and high temperature on the stability and antioxidant capacity of two anthocyanins in aqueous solution. *Food Chemistry*, 163, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.075>
- Timilsena, Y. P., Haque, M. A., & Adhikari, B. (2020). Encapsulation in the Food Industry: A Brief Historical Overview to Recent Developments. *Food and Nutrition Sciences*, 11(06), 481–508. <https://doi.org/10.4236/fns.2020.116035>
- Tonon, R. V., Brabet, C., & Hubinger, M. D. (2010). Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*, 43(3), 907–914. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.12.013>
- Ugurlu, E., & Secmen, O. (2008). Medicinal plants popularly used in the villages of Yunt Mountain (Manisa-Turkey). *Fitoterapia*, 79(2), 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.07.016>
- Viegi, L., Pieroni, A., Guarrera, P. M., & Vangelisti, R. (2003). A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(2–3), 221–244. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.08.003>

- Von Elbe, J. H., Schwartz S.J. (1996). Colorants. in "Food Chemistry". *Fennema OR* (ed.) 3rd ed., Marcel Dekker Inc., New York, p.651-723.
- Wahyuningsih, S., Wulandari, L., Wartono, M. W., Munawaroh, H., & Ramelan, A. H. (2017). The Effect of pH and Color Stability of Anthocyanin on Food Colorant. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 193(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/193/1/012047>
- Wallert, A. (1990). Chrozophora tinctoria Juss. Problems in Identifying an Illumination Colorant. *Restaurator*, 11, 141–155.
- Weatherall, I. L., & Coombs, B. D. (1992). Skin Color Measurements in Terms of CIELAB Color Space Values. *Journal of Investigative Dermatology*, 99(4), 468–473. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12616156>
- Wrolstad, R. E., & Culver, C. A. (2012). Alternatives to those artificial FD & C food colorants. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 59–77. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101118>
- Xu, H., Wang, W., Liu, X., Yuan, F., & Gao, Y. (2015). Antioxidative phenolics obtained from spent coffee grounds (*Coffea arabica* L .) by subcritical water extraction. *Industrial Crops & Products*, 76, 946–954. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.054>
- Yonekura-Sakakibara, K., Nakayama, T., Yamazaki, M., & Saito, K. (2008). Modification and Stabilization of Anthocyanins. *Anthocyanins*, 169–190. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77335-3_6
- Yoshida, K., Kondo, T., & Goto, T. (1991). Unusually stable monoacylated anthocyanin from purple yam *Dioscorea alata*. *Tetrahedron letters*, 32(40), 5579-5580.
- Yoshida, K., Mori, M., & Kondo, T. (2009). Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Natural product reports*, 26(7), 884-915. <https://doi.org/10.1039/b800165k>
- Yousuf, B., Gul, K., Wani, A. A., & Singh, P. (2016). Health Benefits of Anthocyanins and Their Encapsulation for Potential Use in Food Systems: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(13), 2223–2230.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2013.805316>

Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D. P., Li, S., Chen, Y. M., & Li, H. Bin. (2016). Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. *Nutrients*, 8(8), 515. <https://doi.org/10.3390/nu8080515>

Zimon, D., & Domingues, P. (2019). Impact of implementation of ISO 22000 on food safety throughout the supply chain: Insights from Poland, Slovakia & Portugal. *International Journal of Productivity and Quality Management*, 30(4), 509-526. <https://doi.org/10.1504/ijpqm.2019.10023773>