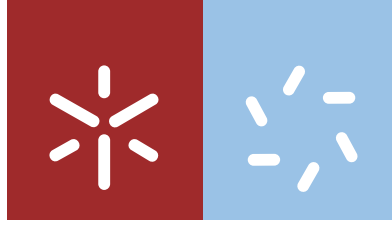


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Sandra Isabel da Silva Dias

Corante natural alternativo ao carmim da cochonilha capaz de conferir tom rosado a fiambre da perna



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Sandra Isabel da Silva Dias

**Corante natural alternativo ao carmim
da cochonilha capaz de conferir tom rosado
a fiambre da perna**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Bioquímica Aplicada
Área de especialização em Biomedicina

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Maria Sameiro Gonçalves
e da
Mestre Regina Pereira

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição

CC BY

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradecer à Professora Doutora Sameiro Gonçalves. Por ter aceitado orientar-me neste projeto, pela imensa disponibilidade e paciência que sempre demonstrou, pela simpatia e ajuda ao longo deste ano e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Departamento de Química/Centro de Química e ao Departamento de Física/Centro de Física da Universidade do Minho por permitir a realização deste projeto nos seus laboratórios e pelas condições disponibilizadas.

Agradecer ao Professor Doutor António Gil Fortes do Departamento de Química da Universidade do Minho.

Agradecer à Professora Doutora Elisabete Coutinho e Doutora Ana Rita Rodrigues do Departamento de Física da Universidade do Minho.

Agradecer à orientadora Mestre Regina Pereira pela disponibilidade, gentileza e prontidão manifestadas durante a realização deste trabalho e também a toda a equipa de Inovação e Desenvolvimento da empresa pela simpatia e ajuda que disponibilizaram a todo o momento.

Agradecer a oportunidade e disponibilidade da empresa Primor para a realização deste projeto, assim como pela boa vontade e disponibilidade com que me receberam nas suas instalações.

À Dra. Elisa Pinto e à Dra. Vânia Azevedo pela disponibilidade e rapidez na realização dos espetros de RMN e massa.

Agradecer ao Doutor Joel Borges pela disponibilidade e prontidão no acesso ao colorímetro.

Ao Professor Doutor David Pereira da REQUIMTE, Universidade do Porto, pela realização dos testes de actividade biológica em linhas celulares e ensaios de HPLC-DAD.

Agradecer a prontidão, amabilidade e atenção da técnica Vitória Maciel do Centro de Engenharia Biológica, da Universidade do Minho.

Às colegas de laboratório Ana Lopes, Raquel Rainha e Cátia Martins por proporcionar um ambiente de trabalho tão agradável e ainda por toda a ajuda e companheirismo dados ao longo deste ano.

Por último, agradecer à minha família em especial à minha irmã pelo interesse, preocupação sempre demonstrados e pelo apoio incondicional durante estes dois anos.

A todos, um enorme obrigado!

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração. Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho

RESUMO

Corante natural alternativo ao carmim da cochonilha capaz de conferir tom rosado a fiambre da perna

Ao longo dos anos, a indústria de alimentos usou corantes para melhorar ou restaurar a aparência original dos alimentos, para garantir a uniformidade e como um indicador da qualidade. O uso de pigmentos naturais tem recebido um interesse crescente neste setor devido à promoção dos efeitos de substâncias naturais na saúde. Corantes sintéticos e até naturais, como o corante carmim (E120) do inseto cochonilha capaz de conferir a cor rosa/carmim, estão disponíveis no mercado e são amplamente utilizados na indústria de alimentos, mas o seu uso não é permitido pela legislação em vários produtos à base de carne. Além das restrições legais, vários fatores relacionados com as propriedades físico-químicas dos corantes responsáveis pela estabilidade das cores, desde a produção e armazenamento até ao consumo, inviabilizam o seu uso no processo de preparação de determinados produtos. Tendo em vista os aspetos mencionados anteriormente, neste trabalho investigou-se a possibilidade de aplicação de corantes naturais, como alternativa ao E120 e outros corantes não permitidos pela legislação em produtos à base de carne processada, designadamente fiambre da perna, a fim de obter uma cor rosada atrativa para o consumidor.

Neste sentido, foram selecionadas algumas espécies vegetais, nomeadamente o *Raphanus sativus* L., *Roselle sabdariffa* L., *Beta vulgaris* L. e *Opuntia stricta*. Foram realizados procedimentos de extração de modo à obtenção dos respetivos extratos contendo corantes naturais, que foram parcialmente caracterizados por técnicas analíticas, bem como avaliados relativamente à estabilidade a diferentes parâmetros físico-químicos (pH, temperatura e luz). Foi obtida a citotoxicidade de vários extratos utilizando uma linha celular AGS. O nanoencapsulamento em sistemas lipídicos de alguns extratos foi efetuado utilizando lecitina de soja e maltodextrina. Os resultados indicam elevadas eficiências de encapsulamento em ambos os sistemas e a ausência de toxicidade relevante para células de cancro gástrico humano dos extratos testados. Os extratos obtidos das espécies anteriormente referidas, após liofilização e encapsulamento em maltodextrina foram aplicados na formulação de fiambre da perna e na sua obtenção em escala piloto. A coloração de amostras de fiambre dos diferentes ensaios foi avaliada visualmente e em colorímetro. Globalmente, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a coloração do fiambre da perna obtida com extrato de *Beta vulgaris* L. liofilizado é muito promissora para futuras aplicações neste tipo de produtos cárneos.

Palavras-Chave: *Beta vulgaris* L., fiambre, *Opuntia stricta*, *Raphanus sativus* L., *Roselle sabdariffa* l.

ABSTRACT

Alternative natural dye to cochineal carmine capable of giving pink hue to ham

Over the years, the food industry has used dyes to improve or restore the original appearance of food, to ensure uniformity and as an indicator of quality. The use of natural pigments has received an increasing interest in this sector due to the promotion of the effects of natural substances on health. Synthetic and even natural dyes, such as carmine dye (E120) from the cochineal insect capable of conferring the pink/carmine colour, are widely available on the market and widely used in the food industry, but their use is not allowed by the legislation in several meat products. In addition to legal restrictions, several aspects related to the physicochemical properties of the dyes responsible for colour stability from the production and storage to the consumption, make their use unfeasible in the process of preparing certain products.

Considering the above mentioned aspects, this work investigated the possibility of applying natural dyes as an alternative to E120 and other dyes forbidden by the legislation in processed meat products, namely ham, in order to get an attractive pink color for the consumer.

In view of the previously mentioned aspects, some plant species were selected, namely *Raphanus sativus* L., *Roselle sabdariffa* L., *Beta vulgaris* L. and *Opuntia stricta*. Extraction procedures were performed in order to obtain the respective extracts containing natural dyes, which were partially characterized by analytical techniques, as well as evaluated for stability at different physical-chemical parameters (pH, temperature and light). The cytotoxicity of various extracts was obtained by using an AGS cell line. Nanocapsulation in lipid systems of some extracts was performed using soy lecithin and maltodextrin. Results indicate high encapsulation efficiencies in both systems, and the absence of relevant toxicity to human gastric cancer cells of the extracts evaluated.

The extracts obtained from the aforementioned species, after lyophilization and encapsulation in maltodextrin were applied in the formulation of ham leg and used in its pilot scale. The color of ham samples from the different assays was evaluated visually and by colorimeter. Overall, the results obtained in this work suggest that leg ham coloration obtained with lyophilized extracts of *Beta vulgaris* L. is very promising for future applications in this type of meat products.

Keywords: *Beta vulgaris* L., ham, *Opuntia stricta*, *Raphanus sativus* L., *Roselle sabdariffa* L.

ÍNDICE

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos	ix
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Esquemas	xiii
Lista de Tabelas	xiv
Comunicações.....	xv
Apresentação da Empresa	xvi
1. Introdução Teórica	17
1.1 Corantes como aditivos alimentares.....	18
1.2 Corantes naturais e sintéticos	19
1.3 Carmim de cochonilha.....	22
1.4 Antocianinas.....	23
1.5 Betalainas	29
1.6 Espécies Vegetais	33
1.6.1 <i>Raphanus sativus</i> L.	33
1.6.2 <i>Roselle sabdariffa</i> L.	34
1.6.3 <i>Beta vulgaris</i> L.....	35
1.6.4 <i>Opuntia stricta</i>	36
1.7 Métodos de extração	37
1.8 Nanoencapsulamento.....	38
2. Produtos cárneos	38
2.1 Aspectos gerais	38
2.2 Fiambre – ingredientes e preparação	39
2.3 A cor da carne.....	42
2.4 Plano e objetivos	44
2. Parte experimental.....	46
2.1 Procedimentos gerais	47

2.2	Obtenção de extratos.....	48
2.2.1	Material vegetal.....	48
2.2.2	Procedimento geral de extração.....	48
2.3	Caraterização dos extratos.....	50
2.4	Estudos de nanoencapsulamento.....	51
2.4.1	Nanoencapsulamento em lipossomas.....	51
2.4.2	Nanoencapsulamento em maltodextrina (DE20).....	52
2.5	Aplicação dos extratos no fiambre.....	52
2.6	Análise colorimétrica.....	52
3.	Resultados e discussão.....	54
3.1	Seleção das espécies vegetais.....	55
3.2	Obtenção de extratos.....	55
3.3	Caraterização dos extratos.....	58
3.4	Nanoencapsulamento.....	67
3.5	Atividade biológica.....	68
3.6	Aplicação dos extratos no fiambre.....	69
3.7	Análise colorimétrica.....	74
4.	Conclusão e perspetivas futuras.....	77
	Bibliografia.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

Abs_{comp} – absorvância do composto

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar Europeia

AGS – adenocarcinoma gástrico

CA – Código Alimentar

CCA – Comissão do Código Alimentar

DMSO – dimetilssulfóxido

DOPA – 3,4 – di-hidroxifenilalanina

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ESI – ionização por eletrospray (do inglês *Electrospray Ionization*)

et al. – *et alia* (do latim, referência a outras pessoas)

EtOH – etanol

E120 – carmim da cochonilha

E122 – carmoisina

E123 – amaranço

E124 – vermelho cochineal A

E127 – eritrosina

E128 – vermelho 2G

E129 – vermelho *allura* AC

E162 – betalaínas

E163 – antocianinas

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (do inglês *Food and Agriculture Organization*)

HACCP – Análise de perigos e controlo de pontos críticos (do inglês *Hazard and Critical Control Point*)

HPLC-DAD – Cromatografia líquida de elevada eficiência (do inglês High-performance liquid chromatography)- detetor de matriz de díodos (do inglês diode array detector)

MD – maltodextrina

m/z – massa/carga

NP – Norma Portuguesa

OMS – Organização Mundial de Saúde

PGAA – Padrões gerais para aditivos alimentares

PPO – oxidase polifenol (do inglês *poliphenol oxidase*)

rpm – rotações por minuto

T. a. – temperatura ambiente

UE – União Europeia

UHPLC-ESI-Q-TOF – Cromatografia líquida de alta performance, acoplada à electropulverização tempo de ionização quadrúpulo (do inglês ultra-high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization-quadrupole-time)

US – Ultrassons

UV – ultravioleta

ϵ – coeficiente de extinção molar (l MOL CM⁻¹)

λ_{abs} – comprimento de onda de absorção máxima (nm)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação dos corantes de acordo com a origem.	20
Figura 2. Estrutura do ácido carminico.....	23
Figura 3. Estrutura geral das antocianidinas.....	24
Figura 4. Antocianidinas mais abundantes na natureza.	26
Figura 5. Estrutura geral das betalainas.	29
Figura 6. Fatores que afetam a estabilidade das betalainas.	30
Figura 7. Estrutura química da pelargonidina 3-diglucósido-5-glucósido 22	33
Figura 8. Estrutura química da cianidina 3 -sambubiósido 23 e delphinidina 3 -sambubiósido 24	34
Figura 9. Estrutura das betacianinas (17, 18) e betaxantinas (27, 28, 29) presentes na <i>Beta vulgaris</i> L..	35
Figura 10. Espetros de absorção do extrato de <i>Raphanus sativus</i> L. após remoção do material vegetal e diluição com água destilada (0,2:2,8; v/v) (A) e solução aquosa preparada a partir do extrato sólido liofilizado (concentração $1,47 \times 10^{-3}$ g/mL) (B).....	59
Figura 11. Solução de extrato de <i>Raphanus sativus</i> L. após a remoção do material vegetal (A) e adição à salmoura (B). Adição do extrato sólido resultante da liofilização à salmoura (C).	59
Figura 12. Espetros de absorção dos extratos de Roselle sabdariffa L. após remoção do material vegetal e diluição com água destilada (0,2:2,8; v/v) correspondentes aos ensaios 2 (A) e 3 (B) da Tabela 3 e solução aquosa preparada a partir do extrato sólido liofilizado correspondente ao ensaio 3 (C) (concentração $1,73 \times 10^{-3}$ g/mL).....	60
Figura 13. Soluções de extrato de <i>Roselle sabdariffa</i> L. após a remoção do material vegetal, relativas aos ensaios 2 e 3 (Tabela 3) (A, B) e adição de ambos à salmoura (C, D). Adição do extrato sólido resultante da liofilização da solução do ensaio 3 à salmoura (E)	61
Figura 14. Espetros de absorção dos extratos de <i>Beta vulgaris</i> L. após remoção do material vegetal e diluição com água destilada (0,2:2,8; v/v) correspondentes aos ensaios 4 (A), 5 (B), 6 (C) e 7 (D) e 8 (E) da Tabela 3 e solução aquosa preparada a partir do extrato sólido liofilizado correspondente ao ensaio 8 (F) (concentração $2,07 \times 10^{-3}$ g/mL).	62
Figura 15. Soluções de extrato de <i>Beta vulgaris</i> L. após a remoção do material vegetal, relativas aos ensaios 4 (A), 5 (B), 6 (C) e 7 (D) e 8 (E) (Tabela 3) e adição à salmoura do extrato 8 (F). Adição do extrato sólido resultante da liofilização da solução do ensaio 8 à salmoura (G).....	63

Figura 16. Espectros de absorção dos extratos de <i>Opuntia stricta</i> após remoção do material vegetal e diluição com água destilada (0,2:2,8; v/v) correspondentes aos ensaios 9 (A), 10 (B) e 11 (C) da Tabela 3 e solução aquosa preparada a partir do extrato sólido liofilizado correspondente ao ensaio 11 (D) (concentração $1,37 \times 10^{-3}$ g/mL).	64
Figura 17. Soluções de extrato de <i>Opuntia stricta</i> após a remoção do material vegetal, relativas aos ensaios 9 (A), 10 (B), 11 (C) (Tabela 3) e adição à salmoura dos extratos 9 (D), 10 (E) e 11 (F). Adição do extrato sólido resultante da liofilização da solução do ensaio 11 à salmoura (G).	65
Figura 18. Possíveis estruturas de derivados da pelargonidina 3 presentes no extrato de <i>Raphanus sativus</i> L. 28-30	67

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Alteração estrutural das antocianinas e respetiva coloração, em função do valor de pH.	27
Esquema 2. Degradação da betanina pela ação da temperatura.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos corantes naturais baseada na estrutura química.	21
Tabela 2. Identificação das diferentes antocianidinas presentes na natureza.	25
Tabela 3. Sistemas de extração realizados no <i>Raphanus sativus</i> L.; <i>Roselle sabdariffa</i> L.; <i>Beta vulgaris</i> L. e <i>Opuntia stricta</i>	48
Tabela 4. Percentagens mássicas de extrato liofilizado obtidas para o <i>Raphanus sativus</i> L., <i>Roselle sabdariffa</i> L., <i>Beta vulgaris</i> L. e <i>Opuntia stricta</i> nos ensaios 1, 3, 8 e 11 indicados na Tabela 3.	57
Tabela 5. Quantidade de antocianinas e betalainas presentes nos extratos liofilizados	65
Tabela 6. Eficiência de encapsulamento dos extratos.	68
Tabela 7. Resultados visuais obtidos pela aplicação dos diversos extratos em diversas	70
Tabela 8. Dados colorimétricos sobre os diferentes extratos e dos diferentes fiambres onde foram aplicados os extratos em diferentes condições.	74

COMUNICAÇÕES

1. Dias, S.; Pereira, D. M.; Castanheira, E. M. S.; Fortes, A. G.; Pereira, R.; Gonçalves, M. S. T. “Natural pigments for colouring processed meat”, comunicação em painel (P26), *IV Simpósio de Química Medicinal*, Braga, Portugal, 24 maio 2019
2. Dias, S.; Pereira, D. M.; Castanheira, E. M. S.; Fortes, A. G.; Pereira, R.; Gonçalves, M. S. T. “Beetroot as a source of natural dyes for ham”, comunicação, The 23rd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-23), <https://ecsoc-23.sciforum.net/>, 15 de novembro a 15 de dezembro 2019, submetida

APRESENTAÇÃO DA EMPRESA

A empresa Primor, S.A. está sediada em Gavião – Famalicão e emprega perto de mil trabalhadores nos mais diversos cargos e nas diferentes unidades que compõem o grupo.

Em 1961, Joaquim Moreira Pinto e Ana Amélia fundam a empresa Joaquim Moreira Pinto & Filhos, Lda. e a marca Primor, dando início a uma tradição familiar no “saber fazer” da charcutaria iniciando a sua atividade na salsicharia, enchidos e peças fumadas. Contudo em 1971 entra em novos segmentos de charcutaria, produzindo fiambres e outras peças cozidas. Distinguindo-se pela sua qualidade, os produtos Primor tornam-se procurados, o que conduz a um aumento de produção e à ampliação das instalações fabris. Em 1982 é criada a Quinta do Gradim, a primeira unidade de produção localizada em Felgueiras.

A Primor adquire a ICM, Indústria de Carnes do Minho, S.A. em 2002 reunindo assim no grupo Primor as valências de matadouro e desmanche de carne que alimenta a produção da empresa e fornece outras empresas.

Em 2011 a Primor adquire 50% do grupo Valinho Angola, detentor da indústria Carnes Valinho – única indústria de charcutaria em Angola e a VDA Distribuição Alimentar (distribuidor de produtos alimentares em Angola, nomeadamente das marcas do grupo Valinho, APHA, CPA, Primor, ICM e Central Carnes) e da Coalho, empresa trader a operar na Europa para o mercado angolano.

Existe uma aposta constante de inovação e desenvolvimento de novos produtos ou até melhoramento de produtos já existentes como também a constante busca pela qualidade na charcutaria que produzem. Para além da marca Primor, existem outras marcas produzidas e desenvolvidas na Primor e os produtos englobados estão desenvolvidos e pensados de acordo com a necessidade do cliente.

A empresa aposta também na formação dos seus colaboradores com vista ao bom funcionamento e à segurança alimentar.

A Primor possui um canal de distribuição nacional e internacional, sendo neste último caso englobados países como a Espanha, França, Alemanha, Luxemburgo, Bélgica, Inglaterra, Brasil. Para a promoção da marca Primor e seus produtos existem dois departamentos, comercial e marketing, a trabalhar em uníssono.

A empresa conta já com várias distinções nos Prémios Escolha do Consumidor na categoria de Grande Consumo &Lar.

1. INTRODUÇÃO TEÓRICA

1.1 Corantes como aditivos alimentares

Desde sempre que o Homem associa a cor a vários aspetos do quotidiano e, conseqüentemente, esta propriedade influencia as várias escolhas no dia-a-dia. Na indústria alimentar, por exemplo, a cor é um factor muito importante, dada a sua interligação ao sabor e aspeto, características relevantes na aceitabilidade dos produtos. Esta relação não pode ser ignorada e aquando da formulação de um produto alimentar a cor é um elemento a ter em consideração.

As civilizações ancestrais já tinham por hábito retirar da natureza substâncias para colorir alimentos com o intuito de melhorar a sua aparência e, ao longo do tempo, o uso de corantes tem sido uma preocupação crescente no setor alimentar e foco de investigação e desenvolvimento por parte desta indústria.

Atualmente, a utilização de corantes e aditivos em alimentos é rigorosamente controlada pela legislação que garante uma aplicação responsável e segura dos mesmos. O Código Alimentar (CA) contém as primeiras diretrizes internacionais destinadas a géneros alimentares e foi estabelecido em 1962 pela Comissão do Código Alimentar (CCA) criada pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e Organização Mundial de Saúde (OMS).¹ Encontra-se inserido na estrutura desta comissão um Comité de Aditivos Alimentares e Contaminantes cujo foco é, como o próprio nome indica, a questão dos aditivos alimentares e contaminantes. Este comité delibera recomendações sobre determinados aditivos e níveis recomendados para consumo. Em conjunto a CCA, FAO e OMS geraram uma base de dados designada Padrões Gerais para Aditivos Alimentares (PGAA) que pretende harmonizar regras internacionais de forma a controlar o comércio livre de alimentos.

A União Europeia (UE) segue o Regulamento da Comissão Europeia N° 1333/2008 que tem por base a livre circulação de géneros alimentares seguros e que contribuí significativamente para a saúde e bem-estar dos cidadãos, assim como para os seus interesses sociais e económicos. De acordo com este regulamento, cada aditivo usado na UE deve passar primeiramente pela avaliação da Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (ASAE), a qual baseia a sua avaliação no parecer emitido pelo Comité de Aditivos Alimentares e Contaminantes. Os aspetos envolvidos na avaliação de um aditivo incluem as especificações químicas e técnicas do composto, descrição do processo de manufatura, métodos analíticos para determinação do composto, reação com alimentos, resumo das autorizações atuais para uso do mesmo, dosagem, informação toxicocinética e dados de toxicidade (toxicidade aguda oral, sub crónica e crónica), atividade cancerígena, genotoxicidade, hipersensibilidade

e toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento.¹ A aprovação do aditivo baseia-se nos conhecimentos do momento, sendo necessária uma revisão constante e atenção sobre novos dados científicos.

Para a rotulagem, e no sentido de eliminar qualquer ambiguidade, o Comité de Aditivos Alimentares e Contaminantes criou um Sistema Numérico Internacional que permite a identificação do aditivo na lista de ingredientes do produto alimentar. Na União Europeia foi implementado um sistema no qual cada aditivo é designado pela letra E (para a Europa) seguindo-se um código de três dígitos.

Os corantes são descritos no Decreto de Lei como “substâncias que conferem ou restituem cor a um género alimentício e incluem componentes naturais de géneros alimentares e substâncias naturais, que normalmente não são consumidas como géneros alimentares nem utilizadas como ingredientes característicos dos géneros alimentares”. Neste regulamento são considerados corantes naturais “as preparações obtidas a partir de géneros alimentares ou de outros materiais de base natural comestíveis obtidas por extração física e/ou química de modo à obtenção seletiva dos pigmentos em relação aos componentes nutritivos ou aromáticos”.²

A aplicação de corantes em alimentos deve assegurar o funcionamento eficaz do mercado interno e, simultaneamente um elevado nível de proteção da saúde humana e dos interesses do consumidor através de procedimentos exaustivos.

1.2 Corantes naturais e sintéticos

Os corantes podem ser classificados de acordo com diferentes parâmetros, tais como origem (natural, sintético, orgânico e inorgânico) (Figura 1), solubilidade e capacidade de cobertura (opacidade).¹

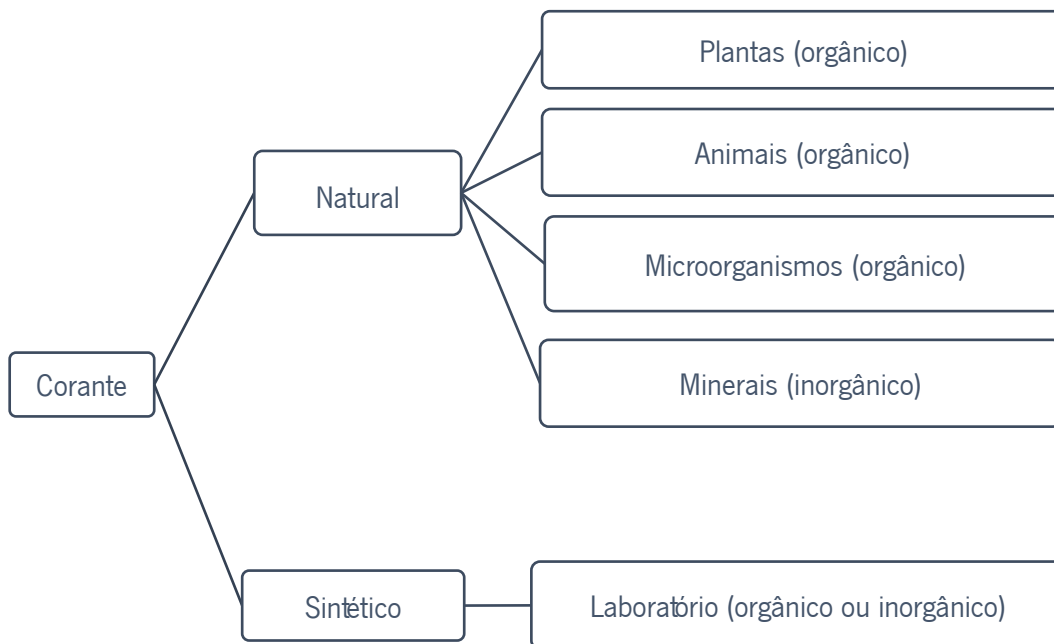


Figura 1. Classificação dos corantes de acordo com a origem.

Há décadas que os corantes naturais sintéticos são utilizados na indústria alimentar, farmacêutica, cosmética, têxtil, mobiliária, entre outras. Sem valor nutricional associado, o objetivo da aplicação de corantes ao nível da indústria alimentar é apenas conferir cor tornando atrativos os produtos onde são inseridos. Amplamente utilizados em formulações de alimentos e bebidas pelo facto de possuírem elevado poder colorimétrico, conferem cores vistosas e apelativas para o consumidor.

Na União Europeia estão identificados quarenta e três corantes com aplicação alimentar, dos quais dezassete são de origem sintética e vinte e seis de origem natural.³ Os corantes sintéticos são produzidos quimicamente e agrupam-se de acordo com a solubilidade podendo ser compostos solúveis em água, insolúveis em água (solúveis em óleos e solventes orgânicos) e lacas.³ Pela natureza tóxica, os corantes insolúveis em água não estão autorizados para utilização na indústria alimentar. Habitualmente, os corantes sintéticos são caracterizados por possuírem boa estabilidade (à luz, temperatura, oxigénio e pH), uniformidade na cor conferida e ausência de contaminantes microbiológicos.^{4,5}

De entre os corantes sintéticos, cuja aplicação tem como objetivo conferir cor vermelha/rosada a alimentos surgem o corante eritrosina (E127), vermelho *allura* AC (E129), carmoisina (E122), vermelho cochineal A (E124), amaranto (E123) e vermelho 2G (E128).

Apesar das múltiplas vantagens dos corantes sintéticos, a sua substituição por corantes naturais tem aumentado gradualmente. Contudo, são ainda reduzidos os estudos sobre fontes de corantes naturais, bem como caracterização e otimização dos processos de extração. Assim, o foco da comunidade científica é encontrar alternativas naturais para corantes sintéticos, bem como novos procedimentos para a obtenção de corantes.

Os corantes naturais podem ser classificados de acordo com a fonte de origem (plantas, animais, microrganismos, minerais; Figura 1) e estrutura química (derivados tetrapirróis, terpenos, O-heterocíclicos, N-heterocíclicos, quinonas e melaninas; Tabela 1).^{6,7}

Tabela 1. Classificação dos corantes naturais, baseada na estrutura química.

Grupo	Composição estrutural geral	Classe de pigmentos
Tetrapirróis	Anéis de pirróis ou tipo pirrol ligados de forma linear ou circular	Clorofilas e hemes
Terpenóides	Derivados de isopreno	Carotenóides e iridóides
N-heterocíclicos	Heterocíclicos de N, conjugados com o anel benzeno	Purinas, flavinas, fenazinas, fenoxazinas e betalainas
O-heterocíclicos	Açúcar ligado a um ou mais grupos hidroxilo ligados ao anel benzeno	Antocianinas e flavonóides
Quinonas	Cetonas cíclicas não saturadas	Benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas
Melaninas	Derivados de tirosina	-

A utilização de corantes naturais apresenta benefícios para a saúde, podendo acrescentar valor nutricional aos produtos. Contudo, estes corantes exibem algumas limitações, designadamente baixa estabilidade à temperatura, luz e pH, necessidade de produção de fontes de extração, associação a contaminantes indesejados característicos da fonte de origem e custo de produção elevado comparativamente aos corantes sintéticos.^{6,7} Alguns corantes naturais são mais estáveis *in vivo* que na

forma isolada, o que sugere que as plantas desenvolveram estratégias para proteger a cor.⁸ Um maior conhecimento do modo como estes corantes existem na natureza é necessário para o desenvolvimento e formas mais estáveis dos mesmos.

O mercado atual oferece opções de corantes naturais passíveis de conferir tom rosado a determinados alimentos, nomeadamente o carmim da cochonilha (E120), antocianinas (E160) e betalainas (E163). Atendendo ao objetivo do presente trabalho e de modo a melhorar a compreensão do mesmo, em seguida será efetuada uma breve abordagem a esses corantes.

1.3 Carmim de cochonilha

O corante carmim de cochonilha (E120) provém do insecto cochonilha (*Dactylopius coccus*), um parasita de certas espécies de catos (*Opuntia stricta sp.*). A cor rosa-avermelhada típica do E120 é resultante da presença do ácido carmínico (Figura 2), cuja principal função é proteger o inseto, afastando os seus predadores. As cochonilhas projetam sangue ou outros fluídos corporais constituídos por ácido carmínico e, assim, afastam o predador em situações de ameaça.

A utilização do carmim de cochonilha estende-se desde a indústria alimentar, farmacêutica e cosmética até à medicina. Este é obtido por extração sólido-líquido, seguida de filtração, surgindo uma solução que pode em seguida sofrer liofilização resultando num pó. A sua comercialização pode ocorrer em ambas as formas, quer em solução ou em pó. A composição do extrato final obtido inclui ácido carmínico, proteínas solúveis, hidratos de carbono, compostos iónicos provenientes do processo de extração e outras moléculas biológicas provenientes da cochonilha.

Existem vários fatores que determinam a qualidade e composição desse extrato final, designadamente, o clima, tipo de solo, estação de recolha, origem geográfica, fases de desenvolvimento do inseto, bem como condições dos processos de extração e purificação.⁹⁻¹¹ De um modo geral, surge em baixos rendimentos e com composição variável. A qualidade e composição determinam o valor comercial do produto, e normalmente maior quantidade de ácido carmínico e menor teor em contaminantes estão associados a valores de mercado elevados.

O ácido carmínico é uma antraquinona conjugada com ácido carboxílico, possuindo um grupo metilo, quatro grupos hidroxilo e uma unidade de glucose, com fórmula molecular $C_{22}H_{20}O_{13}$ (massa molecular de 491g/mol) (Figura 2). Apresenta elevado potencial colorimétrico e boa estabilidade ao pH, luz e temperatura.¹²⁻¹⁴

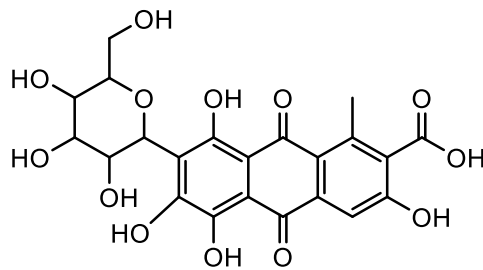


Figura 2. Estrutura do ácido carmínico.

O corante carmim de cochonilha tem sido utilizado em detrimento de alguns corantes sintéticos como o vermelho 2G (E.123), carmoisina (E122), eritrosina (E127), vermelho *allura* AC (E129) e *ponceau* 4R (E124), em diversos produtos alimentares, com dose diária recomendada de 5 mg/kg. Contudo, o seu uso tem levantado algumas questões/problemas, nomeadamente o facto de ser de origem animal, criou uma barreira para consumidores vegetarianos e até algumas dúvidas do foro da proteção animal.¹⁵ Surgiram também alguns casos clínicos associados ao consumo do E120. No entanto, e segundo o relatório da Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos esses casos não estão diretamente ligados ao consumo de E120. A revisão ao uso deste corante foi traduzida no relatório publicado em 2015 no Jornal da Autoridade Europeia, no qual é referido que a quantidade diária admitida não acarreta problemas ao consumidor e como tal não foi alterada.¹⁶

Segundo o Decreto-Lei n.º 120/2011 de 28 de dezembro decretado pelo Parlamento Português, o uso de E120 em fiambres não é permitido e, por esse mesmo motivo, surge a necessidade de encontrar uma alternativa natural a este corante para aplicação nesses produtos cárneos processados.²

1.4 Antocianinas

As antocianinas são pigmentos polifenólicos hidrossolúveis responsáveis por várias cores desde o vermelho ao azul em vegetais, frutos e flores. Geralmente apresentam um espetro de UV/Visível com duas bandas na região 260-280 nm e 490-550 nm.¹⁷⁻¹⁹ Possuem diversas funcionalidades como proteção à ação da luz, mecanismos de defesa contra predadores, conferem cor, atuam como antioxidantes e possuem atividade biológica.^{21,22}

A capacidade antioxidante aumenta o interesse destes pigmentos dado que, para além de conferirem a cor pretendida, aumentam o valor nutricional do alimento. Esta propriedade das

antocianinas tem sido estudada no sentido de prevenir e ajudar na cura de determinadas patologias baseadas no stress oxidativo de células e/ou substâncias presentes no nosso organismo.^{20,22-29}

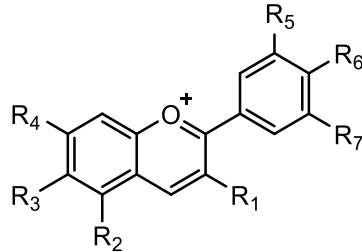


Figura 3. Estrutura geral das antocianidinas.

A estrutura base comum a todas as antocianinas é o ião flavílio ligado a um resíduo de açúcar. Existem várias antocianinas que diferem entre si no número e posição de grupos metilo e hidroxilo, natureza, número e posição de açúcares ligados, assim como no grau e natureza da esterificação com ácidos alifáticos e aromáticos do resíduo de açúcar.³⁰⁻³³

A aglicona das antocianinas é habitualmente designada de antocianidina (Figura 3) e existem na natureza (Tabela 2).³⁶

Tabela 2. Identificação das diferentes antocianidinas presentes na natureza.

Nome	Abreviatura	1	2	3	4	5	6	7	Coloração
Apigeninidina	Ap	H	H	H	H	H	H	H	-
Arrabidina	Ab	H	H	H	H	H	H	OMe	-
Aurantinidina	Au	OH	H	H	H	H	H	H	-
Capensinidina	Cp	OH	Me	H	H	OMe	OH	OMe	Azul-vermelhada
Carajurina	Cj	H	H	OH	H	H	OMe	OMe	-
Cianidina	Ci	OH	H	H	H	H	H	H	Laranja- vermelhada
Delfinidina	Df	OH	H	H	H	H	H	OH	Azul-vermelhada
Europinidina	Eu	OH	Me	H	H	OMe	OH	OH	Azul-vermelhada
Hirsutidina	Hs	OH	H	H	Me	OMe	OH	OMe	Azul-vermelhada
3'-Hidroxi-arrabidina	OHAb	H	H	OH	H	OH	OH	OMe	-
6'-Hidroxi-cianidina	6-OHCi	OH	H	OH	OH	OH	OH	OH	Vermelha
6'-Hidroxi-delfinidina	OHdf	OH	H	OH	H	OH	OH	OH	Azul-vermelhada
6'-Hidroxi- pelargonidina	OHPg	OH	H	OH	H	H	OH	H	-
Luteolina	Lt	H	H	H	H	OH	OH	H	-
Malvidina	Mv	OH	H	H	H	OMe	OH	OMe	Azul-vermelhada
5'-Metil-cianidina	MCi	OH	Me	H	H	OH	OH	H	Laranja- vermelhada
Pelargonidina	Pg	OH	H	H	H	H	OH	H	-
Peonidina	Pn	OH	OH	H	H	OMe	OH	H	Laranja- vermelhada
Petunidina	Pt	OH	H	H	OH	OMe	OH	OH	Azul-vermelhada
Pulchelidina	Pl	OH	Me	H	OH	OH	OH	OH	Azul-vermelhada
Ricionidina A	RiA	OH	H	H	OH	H	OH	H	-
Rosinidina	Rs	OH	H	H	OMe	OMe	OH	H	Vermelha
Tricetinidina	Tr	H	H	H	OH	OH	OH	OH	Vermelha

No entanto, existem seis tipos de antocianidinas mais abundantes, sendo três não-metiladas (cianidina **1**, delphinidina **2** e pelargonidina **3**) e três possuindo grupos metil (peonidina **4**, malvidina **5** e petunidina **6**) (Figura 4).²⁸ Para além dessas, alguns trabalhos referem um novo tipo de antocianidinas metiladas designadas de piroantocianidinas.^{34,35}

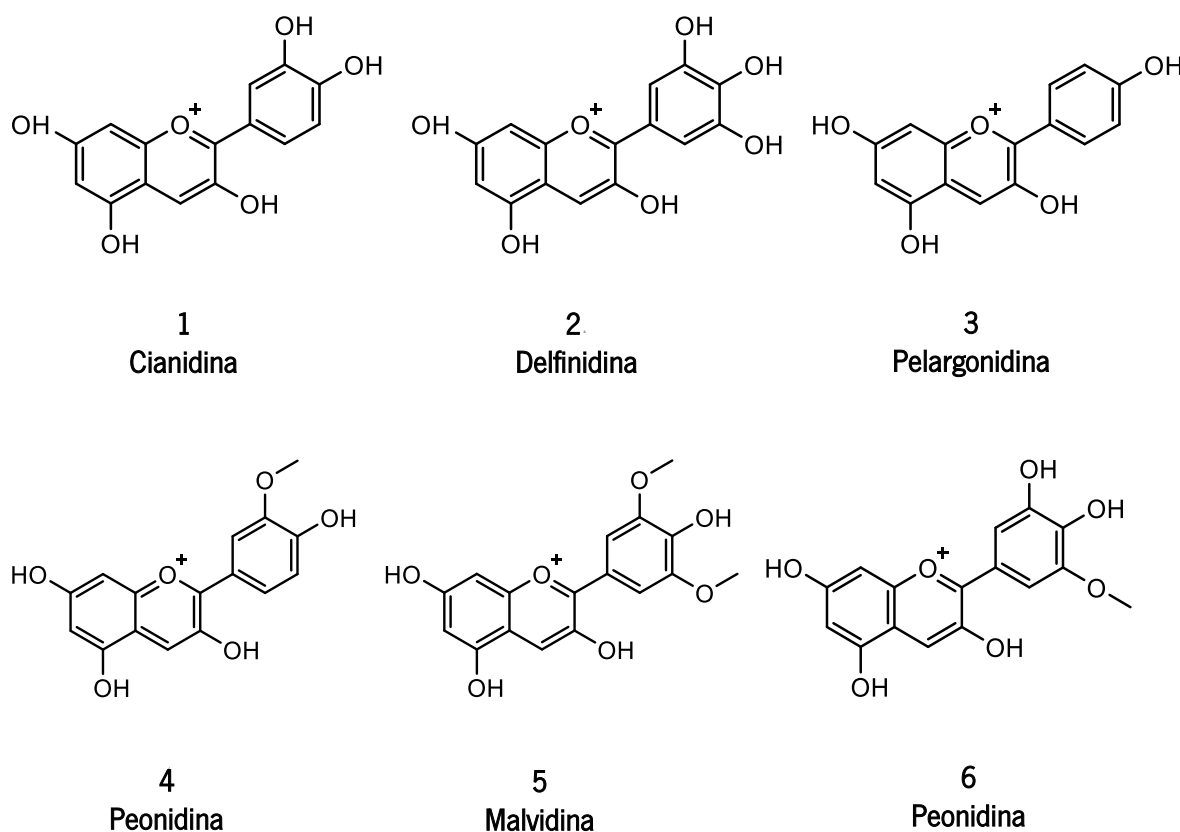


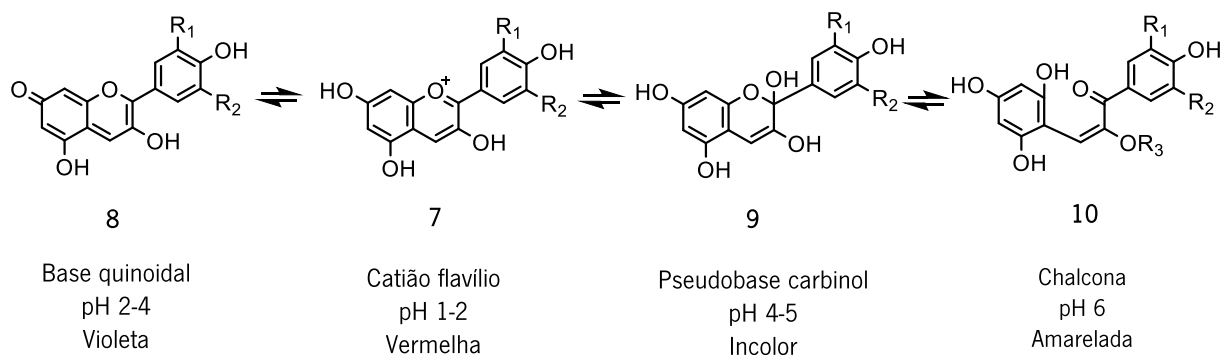
Figura 4. Antocianidinas mais abundantes na natureza.

As diferenças estruturais entre as antocianinas e agliconas (antocianidinas), originam propriedades distintas como estabilidade, cor, copigmentação, atividades antioxidante e biológica^{19,32,36,37} No entanto, a estabilidade destes pigmentos é também influenciada por outros factores, tais como temperatura, pH, oxigénio, luz, presença de compostos fenólicos, enzimas, iões metálicos, açúcares e ácido ascórbico.^{6,39-41}

A temperatura influencia negativamente a estabilidade das antocianinas, sendo vários os trabalhos onde este efeito é reportado.⁴²⁻⁴⁵ Holzwarth e colaboradores mencionam o facto de um aquecimento inicial rápido ajudar a desnaturar as enzimas responsáveis pela degradação de

antocianinas sugerindo que o efeito da temperatura nestes pigmentos dependerá do grau e duração do tratamento térmico.⁴⁴

Devido à natureza iônica das antocianinas, o pH é um fator bastante importante na estabilidade.^{19,28,39,42,46} As cores das antocianinas são determinadas pela proporção das diferentes formas da antocianinas presentes, nomeadamente o catião flavílio **7** (vermelho), base quinoidal **8** (violeta), chalconas **10** (amarelada) e pseudobase ou carbinol **9** (incolor) e em condições ácidas (pH 1-2), a cor apresentada pela antocianina é vermelha sendo indicadora da presença maioritária do catião flavílio **7**. O aumento de pH traduz-se em variações na cor, desde o violeta (pH 2-4) devido à base quinoidal **8** até ao incolor (pH 4-5) e amarelado (pH 6) da pseudobase **9** e chalcona **10**, respetivamente (Esquema 1).⁴⁷



Esquema 1. Alteração estrutural das antocianinas e respetiva coloração, em função do valor de pH.

Na presença de oxigénio foi constatada a diminuição da estabilidade destes pigmentos, pois ocorre a oxidação dos compostos em solução que estabilizam estes pigmentos.^{45,48}

A luz interfere negativamente na estabilidade das antocianinas provocando alteração da cor, por fotodegradação.^{42,49,50}

Hubbermann *et al.* reportaram a influência de alguns sais e enzimas em soluções de antocianinas, tendo verificado que os efeitos destas substâncias em determinadas concentrações, eram nocivos à estabilidade destes pigmentos.^{51,52} Contudo, a presença da enzima pectina melhora a cor das antocianinas e, conseqüentemente dos produtos alimentares onde são aplicadas. Por outro lado, a inativação da polifenoloxidase (PPO) que ocorre pelo aumento da temperatura, por exemplo no passo inicial de extração, também melhora a estabilidade.^{44,52}

A complexação de um ião metálico com o catião de flavílio é considerada uma via alternativa para a estabilização da cor.^{27,36} A presença de moléculas de água vai diminuir a estabilidade, uma vez

que essas moléculas ligam-se ao catião flavílio e em competição com outros grupos químicos esta associação predomina.⁵³

A presença de açúcares em solução com antocianinas leva a um processo de estabilização, de acordo com o trabalho de Hubbermann *et al.*⁴⁴

O ácido ascórbico, em determinadas concentrações, provoca a destabilização das antocianinas e, conseqüentemente, a perda da cor. Skrede e colaboradores, referem o facto de o ácido ascórbico estabilizar estes pigmentos, contudo fatores como temperatura, oxigénio e iões metálicos têm de ser tidos em conta para que este processo aconteça.^{51,54}

A copigmentação é um processo que contribui para a intensificação da cor de um determinado pigmento, e consiste na associação deste a determinadas substâncias, designadas copigmentos. No caso da copigmentação de antocianinas, este processo visa a proteção do catião flavílio, melhorando a sua estabilidade.^{30,41,42,55} O copigmento pode ser outra antocianina (auto-associação ou copigmentação intramolecular), metais (complexação), flavonóides, alcalóides, aminoácidos ou nucleótidos (copigmentação intermolecular). Podem ocorrer em simultâneo diferentes tipos de associações.^{27,36} É sugerido em vários trabalhos que a copigmentação intramolecular, comparativamente à copigmentação intermolecular, origina estabilidade superior.^{37,42}

O pH e a temperatura são fatores relevantes na copigmentação natural sendo esta favorecida por valores de pH na região 1-7 e baixas temperaturas. Valores elevados de pH e temperatura afetam negativamente este processo.^{42,43,56}

Existe no mercado um corante natural constituído por antocianinas o E163.⁵⁷ Este corante é obtido por extração com água sulfitada, água acidificada, dióxido de carbono, metanol ou etanol, a partir de variedades naturais de plantas e frutos comestíveis, e possui constituintes comuns das mesmas, nomeadamente antocianinas, ácidos orgânicos, taninos, açúcares, minerais, etc., não necessariamente na mesma proporção das plantas de origem.²

A aplicação de antocianinas tem sido alvo de estudos baseados principalmente no seu poder colorimétrico e capacidades antioxidante e anticancerígena, entre outras.^{20,27,28,32,48,58}

O uso de corantes de antocianinas, em alternativa aos corantes sintéticos, poderá ser interessante em diversas áreas, designadamente na indústria alimentar, tal como referido anteriormente.

1.5 Betalaínas

As betalaínas são compostos nitrogenados hidrossolúveis, que apresentam cor e comportamento semelhantes às antocianinas. As fontes de origem natural incluem várias plantas, tais como o amaranto, beterraba, frutos de catos opuntia, entre outras. Estes compostos têm como principais funções intervirem na polinização e servirem como pesticidas contra determinados predadores aumentando a resistência e defesa da planta.

Estruturalmente as betalaínas são derivados do ácido betalâmico **11**, que condensado com grupos amina ou aminoácidos origina as betaxantinas **12** e com ciclo-Dopa dá origem às betacianinas **13** (Figura 5).⁵⁹⁻⁶² Estas duas classes de betalaínas, ou seja as betacianinas **12** e betaxantinas **13**, apresentam cores amarela e vermelha-azulada, respectivamente.

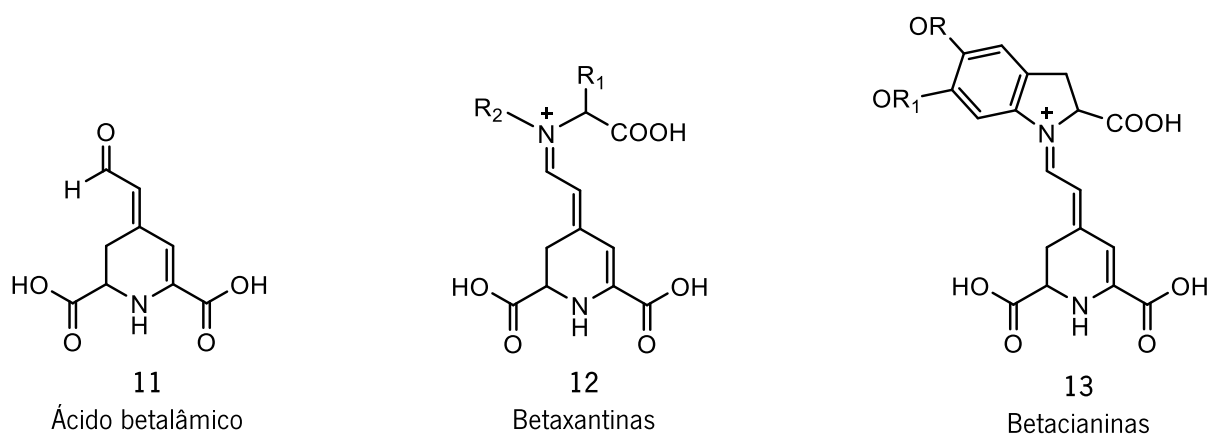


Figura 5. Estrutura geral das betalaínas.

As betacianinas surgem no espectro de absorção de UV/Visível na região 535-540 nm e apresentam a 270-280 nm o sinal correspondente à ciclo-3,4-dihidroxifenilalanina (ciclo-DOPA). As betaxantinas **12**, apresentam uma banda de absorção a 480 nm e outra a 406 nm devida ao ácido betalâmico.^{6,59,63}

No entanto, dependendo dos substituintes dos grupos amina/aminoácidos, no caso das betaxantinas **12**, e da glicosilação ou acilação, no caso das betacianinas **13**, podem observar-se desvios do comprimento de onda máximos referidos.

As betalainas possuem coeficientes de extinção molar (ϵ) elevados, o que resulta num poder tintorial interessante e competitivo com o dos corantes sintéticos.⁶⁴

A betanidina é a aglicona comum da maior parte das betacianinas e diferentes substituições (glicosilação ou acilação) no resíduo dão origem às diferentes betacianinas existentes. A glicosilação da betanidina traduz-se num desvio hipsocrómico, enquanto a acilação resulta num desvio batocrómico.

Tal como no caso das antocianinas, a estabilidade da cor das betalainas é influenciada pela estrutura química, temperatura, luz, oxigénio, atividade da água, época de colheita e armazenamento, solventes de extração, copigmentação e presença de outros compostos como antioxidantes e agentes quelantes.

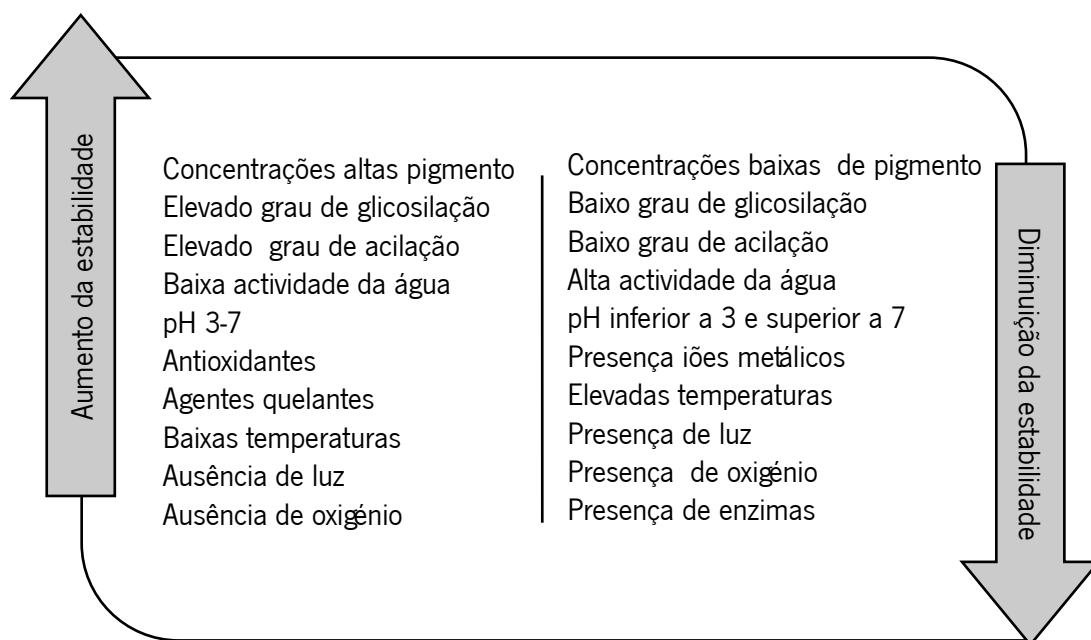


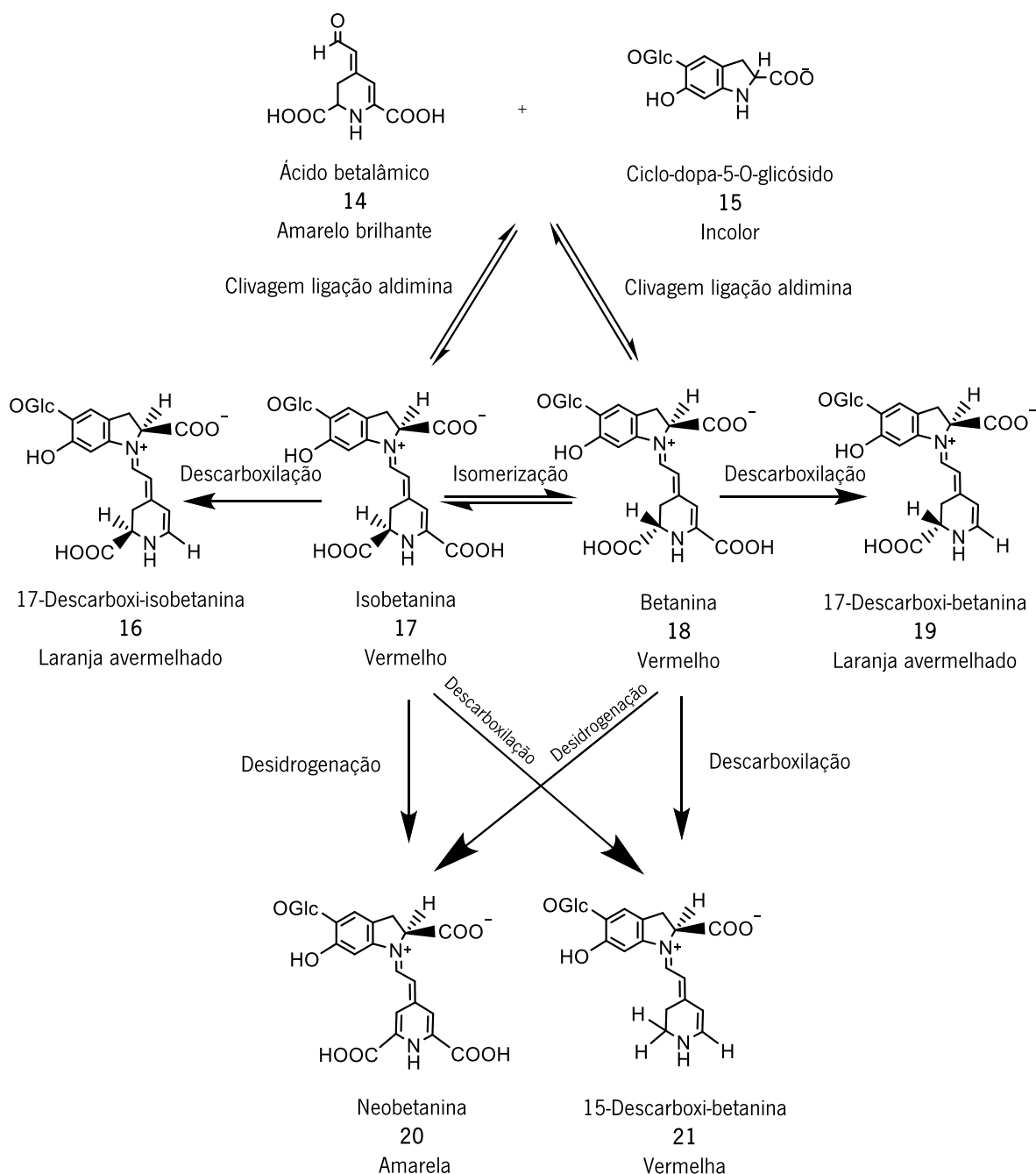
Figura 6. Fatores que afetam a estabilidade das betalainas.

As diferenças estruturais resultam em variações nos níveis de estabilidade do pigmento, sendo reportado que as betacianinas apresentam estabilidade superior às betaxantinas, à temperatura ambiente, aquecimento e a valores de pH ácidos. Esta estabilidade tende a aumentar com o grau de glicosilação ou acilação.^{63,65-68}

Comparativamente às antocianinas, as betalainas apresentam maior estabilidade a valores de pH entre 3 e 7, permitindo o uso destas numa vasta gama de produtos alimentares. Para valores de pH inferiores a 3 ocorre um desvio hipsocromico no comprimento de onda de absorção máxima e a

valores de pH superiores a 7, o λ_{abs} desvia-se batocromicamente, com diminuição dos coeficientes de extinção molar em ambos os casos.^{6,13,62,69-71}

A estabilidade térmica de soluções de betanina (forma glicosilada ou acilada da betanidina) depende do pH, quando sujeita a temperaturas elevadas a betanina altera a sua cor de vermelho para acastanhado.



Esquema 2. Degradação da betanina pela ação da temperatura.

O factor determinante na degradação das betalainas é a temperatura e o tempo de exposição.^{6,13,59,67-70,72-75} A degradação térmica leva à isomerização, descarboxilação ou clivagem das betalainas e o resultado final é a redução gradual da cor vermelha e o aparecimento da cor acastanhada (Esquema 2).⁷²

A água mostrou ser um fator desestabilizador das betalainas, dado que torna susceptível a clivagem da ligação aldimina, resultando na perda de cor. Assim, o uso de betalainas é recomendado em produtos alimentares contendo baixo teor em água.^{6,76,77}

O efeito da luz nas betalainas tem sido alvo de vários estudos. Nos trabalhos realizados por Herbach *et al.*⁷⁸ e Skopinska *et al.*⁷⁹, a luz foi considerada um fator prejudicial à estabilidade das betalainas, tendo sido verificado que a degradação era acelerada pela presença de oxigénio.^{78,79} No entanto, a recuperação destes pigmentos pode ocorrer se a concentração de oxigénio a que são expostos não for muito elevada.^{76,77}

A presença de metais (como ferro, alumínio e cobre) acelera a degradação das betalainas, uma vez que estes pigmentos formam facilmente complexos com metais. Contudo, esta situação pode ser minimizada pela adição de agentes quelantes (EDTA ou ácido cítrico) que se associam de modo a neutralizar a carga positiva do átomo de nitrogénio das betalainas.^{78,82-84}

Antioxidantes como o ácido ascórbico ou isoascórbico mostraram melhorar a estabilidade das betalainas. No entanto, a concentração para que este efeito ocorra ainda não está completamente estabelecida, sendo que em determinadas concentrações estas substâncias atuam como oxidantes do pigmento.^{78,80} A presença ou adição destes antioxidantes melhoram a regeneração, assim como protegem as betalainas durante o tratamento térmico de alguns alimentos.

Agentes quelantes, como referido anteriormente, pode funcionar no sentido de estabilizar as betalainas. O mecanismo destes baseia-se na neutralização do núcleo das betalainas pela associação destes agentes com a carga positiva do átomo de nitrogénio.^{78,84}

A adição de conservantes como pectina ou ágar-ágar poderá também ajudar no processo de estabilização das betalainas. Ravichandran *et al.* utilizaram estes conservantes como matrizes de encapsulamento.⁸⁵

As betalainas apresentam copigmentação, sendo que a taxa de degradação é superior em soluções de betacianinas puras relativamente às soluções não puras, sugerindo um efeito protetor por parte de compostos naturais presentes na espécie vegetal de origem.^{7,67,68,86,87}

A capacidade antioxidante das betalainas tem sido estudada com o propósito da sua aplicação contra determinadas patologias nas quais o stress oxidativo tem um papel importante, como por exemplo no cancro e em cardiopatias.^{53,68,88-92}

Atendendo às propriedades físico-químicas, às capacidades terapêuticas mencionadas, assim como ao consumo não tóxico, os pigmentos de betalainas são uma alternativa saudável e segura aos corantes sintéticos na área alimentar.

1.6 Espécies Vegetais

1.6.1 *Raphanus sativus* L.

Raphanus sativus L., rabanete, pertencente à família *Brassicaceae* e é utilizado para consumo diário em todo o mundo devido ao seu sabor adocicado, refrescante e picante. Devido à presença de antocianinas na sua composição, que conferem a cor rosada da sua pele exterior, este vegetal tem despertado um interesse particular.

As antocianinas presentes no *Raphanus sativus* L. são a pelargonidina-3-diglucósido-5-glucósido **22**, e as suas formas aciladas com resíduos de ácido caféico, β -cumárico, ferúlico e/ou malónico (Figura 7).^{37,93-97}

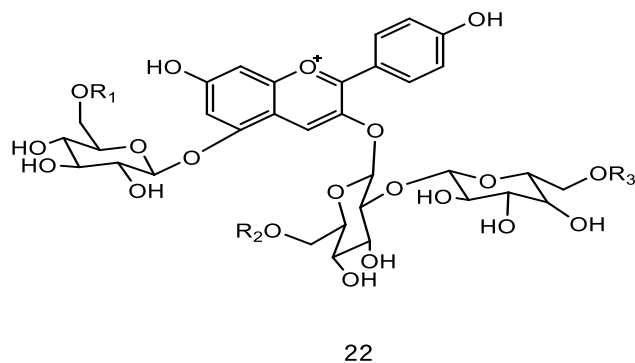


Figura 7. Estrutura química da pelargonidina 3-diglucósido-5-glucósido **22**.

Tal como foi referido anteriormente, as antocianinas têm sido alvo de estudos, devido ao seu potencial colorimétrico, nutracêutico e antioxidante. A presença de antocianinas no *Raphanus sativus* L. tem motivado o seu estudo, no sentido da otimização dos processos de extração e/ou armazenamento dos pigmentos em questão.^{37,56,98-100} A relação entre os diferentes fatores que influenciam a estabilidade

das antocianinas e o(s) solvente(s) e condições de extração é importante e deve ser tida em consideração.^{56,97}

Diferentes estudos têm sido efetuados com o objetivo de estabilizar e obter a maior quantidade possível de antocianinas provenientes do *Raphanus sativus* L.. O metanol, etanol e água são dos solventes mais utilizados para realizar extrações de antocianinas para posterior consumo humano. A associação destes solventes a determinados ácidos, tais como, ácido cítrico, ácido acético e ácido clorídrico é também habitual dado que permitem que a solução de extração adquira um pH ácido idêntico ao do ambiente em que as antocianinas se encontram no vegetal e assim facilitam a sua estabilização. Contudo, o metanol e o ácido clorídrico têm sido considerados tóxicos para a saúde humana.

No processo de extração é mencionado um passo adicional para remoção do cheiro desagradável proveniente da degradação dos glucosinalatos, efetuado através da inativação das enzimas mirosinase.^{100,101}

1.6.2 *Roselle sabdariffa* L.

Roselle sabdariffa L., hibisco, é um género de plantas com flor, inserida na família das *Malvaceae* proveniente do este de África e cultivado nos trópicos.¹⁰² A composição destas plantas inclui antocianinas, bem como flavonóides e polifenóis.^{103,104} A quantidade de antocianinas presentes na flor, mais especificamente nas suas pétalas, é cerca de 2,5 g/100 g de antocianinas (pétalas secas).¹⁰⁴ Entre as antocianinas presentes surgem a cianidina e a delphinidina glicosiladas, mais concretamente a cianidina 3-sambubiósido **23** e delphinidina 3-sambubiósido **24**, que contribuem para a atividade antioxidante desta planta (Figura 8).¹⁰⁵⁻¹⁰⁸

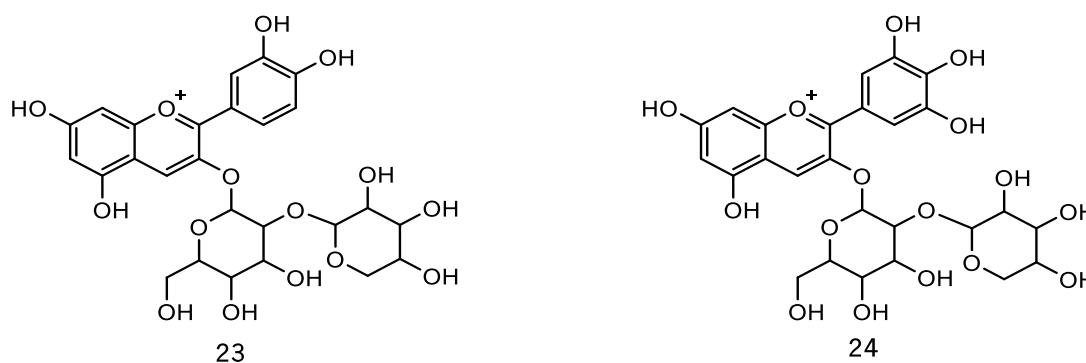


Figura 8. Estrutura química da cianidina 3 -sambubiósido **23** e delphinidina 3 -sambubiósido **24**.

O potencial do *Roselle sabdariffa* L. encontra-se em estudo. Contudo, a sua aplicação na indústria alimentar tem vindo a ser desenvolvida, incluindo já a sua utilização como emulsionante para produção de doces e sumos, corante natural para determinados produtos, e utilização como chá.^{109,110} As propriedades medicinais, tais como diurética, antisséptica, laxativa, antioxidante e anticancerígena que o extrato apresenta justificam algumas das suas aplicações.^{20,49,110-122}

Atendendo à sua importância, têm sido reportados alguns estudos que incidem sobre o método de extração de antocianinas do *Roselle sabdariffa* L. e as condições ótimas de armazenamento para melhorar a estabilidade destes pigmentos.^{104,107,111,114,115,122-124} Os solventes mais utilizados para a extração são etanol, água e metanol, em conjunto com a adição de ácidos tais como ácido cítrico, ácido clorídrico e ácido acético para estabilizar os pigmentos. Devido à instabilidade das antocianinas, o encapsulamento destes pigmentos em matrizes como maltodextrinas, carragenato e lipossomas tem sido sugerido como forma de minimizar esta limitação.^{13,77}

1.6.3 *Beta vulgaris* L.

Beta vulgaris L., beterraba, é uma planta herbácea da família *amaranthaceae* caracterizada pela sua cor vermelha escura e sabor intenso. Entre os diferentes constituintes da *Beta vulgaris* L. surgem as betalainas predominando duas betacianinas (isobetanina **17** e betanina **18**) e três betaxantinas (indicaxantina **27**, vulgaxantina I **28** e vulgaxantina II **29**)^{79,85,125-127}, que lhe conferem a cor característica e estão associadas à sua capacidade antioxidante (Figura 9).¹²⁸

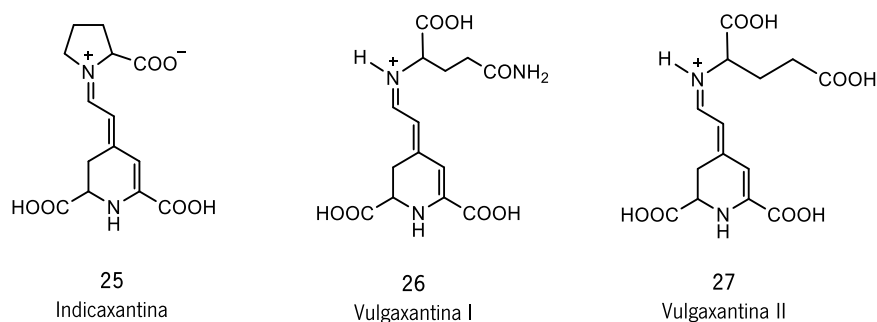


Figura 9. Estrutura das betacianinas (17, 18) e betaxantinas (27, 28, 29) presentes na *Beta vulgaris* L..

A presença destes pigmentos de elevado potencial tem motivado estudos de extração e aplicação dos mesmos nas mais diversas áreas, designadamente área alimentar, cosmética e em técnicas/testes laboratoriais baseados em reações ácido-base¹²⁹⁻¹³¹ Para além disso, surgem também

estudos relacionados com a capacidade antioxidante em aplicações ao nível determinadas patologias, desencadeadas por processos de oxidação de tecidos, células e compostos.^{63,71,132-134}

Existe no mercado um corante natural, o E162 que tem como base pigmentos obtidos a partir da *Beta vulgaris L.* por extração aquosa ou do sumo resultante da compressão deste vegetal.²

Uma desvantagem da utilização da *Beta vulgaris L.* é o seu sabor intenso derivado da presença de geosmina que pode ser transferido para o produto aplicado, sendo desagradável sobretudo na indústria alimentar.¹³⁵

Na extração das betalainas devem ser tidas em atenção as condições ótimas de estabilidade destes pigmentos, de modo a obter a melhor eficiência de extração com o mínimo de degradação.^{67,70,75,79,87}

Entre os solventes que têm sido reportados para a extração de pigmentos a partir da *Beta vulgaris L.* surge o etanol, metanol, água e os ácidos clorídricos e cítrico, necessários à estabilização dos pigmentos.

Devido à sua natureza, os pigmentos extraídos apresentam alguma instabilidade em determinadas condições de aplicação e/ou armazenamento. No entanto, estudos efetuados mostraram que a estabilização dos pigmentos podem ocorrer por encapsulamento em diferentes matrizes, nomeadamente maltodextrinas, goma de acácia e amidos.^{85,13}

1.6.4 *Opuntia stricta*

Opuntia stricta, opuntia, é um género botânico da família *cactaceae* que compreende entre 200 a 300 espécies e é proveniente de zonas áridas e semiáridas. Estes catos de grandes dimensões originam frutos de diversas cores (amarelo, vermelho ou laranja), nos quais tem sido referida a presença de compostos com atividade analgésica, anti-inflamatória, antioxidante, hipoglicémica, anticancerígena e potenciadores do sistema neurológico. Destaca-se também o poder colorimétrico dos pigmentos presentes nesses frutos com potencial para aplicação na área alimentar e cosmética, entre outras.^{18,89,137-139}

As propriedades da *Opuntia stricta* têm sido associadas à presença de betalainas, com diferentes estruturas químicas e composições variadas o que também resulta nas cores distintas dos seus frutos.^{24,138}

A utilização destes frutos como fonte de pigmentos é referida como benéfica uma vez que apresentam baixos riscos de contaminação microbiológica, não possuem nitratos associados, nem

sabor desagradável, para além das interessantes propriedades nutricionais, tais como elevados níveis de cálcio, magnésio e vitamina C.¹³⁷

O processo de extração das betalainas tem sido alvo de vários estudos, na tentativa de otimização das condições experimentais, designadamente da temperatura, pH e exposição à luz.^{69,73,140-142}

A instabilidade dos pigmentos extraídos tem direcionado os estudos no sentido de minimizar esta limitação, tendo o encapsulamento dos mesmos em matrizes de maltodextrina, inulina ou proteína de soja surgido como uma possibilidade interessante.^{74,143}

Relativamente à *Opuntia stricta*, espécie selecionada para este trabalho, é referida na sua composição a presença de apenas betanina e isobetanina igualmente encontradas na *Beta vulgaris* L. e em todas as espécies opuntia. Contudo, a *Opuntia stricta* apresenta a maior quantidade de betacianinas e com estabilidade superior comparativamente a extratos de frutos de outras espécies de opuntia.⁶⁹

1.7 Métodos de extração

Entre os vários métodos de extração de compostos a partir de fontes vegetais no caso dos pigmentos é frequente a utilização da extração sólido-líquido. Neste método, o material vegetal é colocado em contato com o solvente, que penetra nas células, solubiliza os metabolitos/compostos e, por fim, difunde-se para o exterior da célula arrastando os metabolitos celulares.

A maceração é um processo que consiste no contato da amostra vegetal com um solvente extrator com agitação constante durante um determinado período de tempo.

Após a extração, o material sólido é removido por filtração ou decantação, e o extrato é recolhido.

Um outro processo é a extração assistida por ultrassons, na qual o material vegetal está em contato com o solvente e pela ação do ultrassons ocorre a ruptura da membrana celular libertando-se os metabolitos nelas existentes.

A extração por Soxhlet é uma técnica que recorre ao uso de uma fonte de aquecimento do solvente. A amostra vegetal colocada num cartucho de celulose e o solvente só entra em contato com esta quando atinge a ebulição seguida de condensação. O extrato resultante não necessita de ser separado do material vegetal o que facilita o processo de extração.

O facto de neste processo ocorrer aquecimento poderá ser desvantajoso para a extração dos pigmentos de espécies vegetais.

1.8 Nanoencapsulamento

A natureza instável dos pigmentos constitui uma limitação à sua aplicação nas mais diversas áreas (alimentar, farmacêutica e cosmética). No entanto, esta limitação pode ser minimizada pela incorporação dos pigmentos em sistemas de nanoencapsulamento, como foi referido anteriormente.

O nanoencapsulamento baseia-se na formação de partículas de diâmetro entre 1 e 1000 nanómetros, podendo estas serem sólidas (nanopartículas lipossomais sólidas) ou condensadas (vesículas e microemulsões). As nanopartículas podem ser de dois tipos, ou seja, nanoesferas e nanocápsulas, sendo que nas nanoesferas o composto é adsorvido ou encapsulado no interior da partícula. No caso das nanocápsulas o composto é imerso num líquido dentro de uma cavidade rodeada por uma membrana polimérica ou é apenas transportado nesta mesma membrana.

O sistema de nanoencapsulamento a usar depende do tamanho, forma, natureza e possível aplicação dos compostos a encapsular. No caso do encapsulamento de pigmentos para a área alimentar, o sistema lipossomal é o mais adequado.

A maior vantagem das nanopartículas assenta no facto de requerer reagentes pouco tóxicos, ser efetuado de forma simples, ser seguro e permitir uma taxa de eficiência elevada na aplicação, por exemplo em sistemas terapêuticos.

Existem vários nanosistemas lipossomais, que podem ser obtidos por diferentes métodos, dos quais foram usados neste trabalho. Estes formam estruturas multivesiculares que protegem o pigmento da degradação e permitem a solubilidade do mesmo aquando a sua aplicação.

2. PRODUTOS CÁRNEOS

2.1 Aspetos gerais

A indústria alimentar é conduzida pela busca do consumidor por produtos com elevada qualidade, baixo processamento, mínimo teor em aditivos adicionados, tempo de prateleira estável e seguros para a saúde.

Relativamente à indústria das carnes processadas, como é o caso do fiambre, a cozedura é reconhecida como um processo de preservação e segurança alimentar influenciando também o sabor do produto final e a sua cor.

A monitorização da qualidade da carne antes do processamento, considerando os fatores intrínsecos bem como os fatores extrínsecos e as suas interações é um pré-requisito que determina a qualidade do produto final. É possível elaborar formulações que incluem a adição de ingredientes e/ou tratamentos físicos para compensar a baixa qualidade da carne, contudo nenhuma destas técnicas pode substituir uma carne fresca de boa qualidade.

A atividade microbiológica de um produto cárneo é influenciada pela espécie do animal, estado de saúde, práticas de abate, medidas sanitárias dos manuseadores da carcaça, tipo de embalagem, tempo e temperatura de armazenamento. A segurança dos alimentos é assegurada por uma abordagem preventiva, incluindo boas práticas de higiene e aplicação de procedimentos baseados na análise de perigos e controlo de pontos críticos (HACCP).^{144,145}

O consumidor associa a cor vermelha brilhante a carne fresca e a cor castanha à frescura da carne. Estas cores resultam da concentração de mioglobina presente no músculo, do seu estado de oxigenação ou oxidação, e pode variar de espécie para espécie.

Embalagens com atmosferas ricas em oxigénio são tipicamente usadas para prolongar a cor vermelha das carnes após o seu processamento. Essas embalagens são colocadas em cabines refrigeradas de acesso ao consumidor. A luz existentes nestes equipamentos também afeta a cor e estabilidade do produto cárneo, pelo que este aspeto deve ser tido em consideração na otimização das condições a utilizar para prolongar o tempo de prateleira de um determinado produto.

2.2 Fiambre – ingredientes e preparação

O fiambre é um produto à base de carne, preparado a partir de carne de suíno salmourada, prensada ou não em moldes e sujeita a tratamento térmico. O fiambre é classificado em diferentes categorias, designadamente fiambre da perna extra, fiambre da perna superior, fiambre da perna, fiambre da pá e fiambre corrente.

O produto objeto deste trabalho é o fiambre corrente definido como um preparado a partir de carne de suíno à qual foram adicionados ingredientes podendo ou não ser adicionadas proteínas não cárneas e amidos. Na formulação deste tipo de fiambre, a carne de suíno, a água e/ou gelo e sal são considerados ingredientes essenciais, enquanto os produtos não cárneos, aromas, amidos, açúcares, geleias de cobertura e outros aditivos são ingredientes facultativos.

O fiambre corrente deve possuir determinadas características físico-químicas, respeitando as Normas Portuguesas em vigor (NP 1612,1613,1614,1842,1846,1847 e 2150). O produto final deve

apresentar-se sob a forma de bloco ou fatias e ao corte deve possuir uma superfície húmida com cheiro e sabor característicos.

A produção de fiambre corrente compreende as seguintes etapas: seleção de matéria-prima, desmanche, refrigeração, preparação da salmoura, injeção e tenderização, massagem, enchimento, cozedura e refrigeração e armazenamento

A seleção da matéria-prima consiste em escolher peças de carne isentas de maus cheiros, feridas e hematomas e com estas procede-se ao desmanche removendo-se os coágulos e outras sujidades.

A refrigeração compreende a colocação da carne numa câmara, com uma temperatura entre 0° e 2°C, de modo a prevenir o desenvolvimento bacteriano aquando de transporte da matéria-prima para o local de transformação.

A preparação da salmoura consiste na mistura dos aditivos necessários em quantidades adequadas, conforme a formulação pré-definida, de modo a obter-se o produto final desejado. A água utilizada na salmoura deve ser fria, e para que possa atingir a temperatura ideal substitui-se 20 a 30% da quantidade de água por gelo, de modo a atingir a temperatura entre -2 e 2°C.

Os ingredientes que constituem a salmoura devem conferir-lhe as características seguintes:^{146,147}

- Água – aspeto húmido.
- Sal – sabor, maciez, redução da atividade da água (protege contra crescimento dos microorganismos indesejáveis) e solubilização das proteínas da carne.
- Proteína – aumento do conteúdo protéico do produto final e retenção de água.
- Açúcares – redução da atividade da água, promoção da cor e sabor, redução dos nitratos a nitritos e dificultar a redução da mioglobina em metamioglobina.
- Fécula de batata – gelificação por ação do calor formando uma rede tridimensional que retém quantidades significativas de água, e conseqüentemente aumenta o volume do produto final.
- Nitritos – conservante que origina a conversão da mioglobina a nitrosomioglobina conferindo uma cor rosada ao produto final, concede aroma e sabor e inibe seletivamente o desenvolvimento de microorganismos patogénicos.
- Fosfatos – aumentam a capacidade de retenção de água e favorecem a solubilidade das proteínas, dado que formam complexos com iões cálcio e magnésio levando ao relaxamento da rede de proteínas devido à quebra de ligações.
- Espessantes/gelificantes – conferem consistência e textura compacta ao produto final.

- Antioxidantes – reduzem o nitrito a óxido nitroso formando a nitrosomioglobina e, portanto, promovem a formação da cor rosada e dificultam a oxidação das gorduras.

Após a preparação da salmoura, procede-se à injeção, que consiste na difusão homogênea da salmoura na carne, recorrendo a agulhas injetoras que possuem orifícios cruzados na extremidade para permitirem a saída da solução. Antes de iniciar a injeção efetua-se a medição da temperatura da carne (que deverá encontrar-se próxima de 5°C) e da salmoura (que deverá situar-se entre os -2 e 2°C).

A tenderização consiste na passagem da carne entre dois cilindros contendo lâminas que golpeiam a carne de modo que os golpes que a atingem levem à extração da proteína solúvel, à distribuição e à homogeneização da salmoura e também ao aumento da capacidade de absorção de substâncias líquidas nas etapas seguintes. No final da tenderização é medido o pH da carne (que deverá estar compreendido entre 5,8 e 6,2).

Na massagem no bombo, os pedaços de carne são elevados pelas saliências do interior do mesmo até ao seu ponto mais alto, até caírem e o impacto da queda produz uma intensa ação mecânica, danificando a estrutura muscular da carne. Esta etapa do processo é essencial a extração da proteína solúvel, que decorre do processo de massagem, faz com que a carne fique extremamente envolvida por uma goma de consistência gelatinosa, que irá auxiliar na coesão da carne durante a cozedura e simplificará depois a remoção do produto cárneo do molde.

O enchimento consiste em colocar a massa já massajada e maturada no interior de sacos plásticos específicos (tripa), a partir de uma enchedora a vácuo que elimina todo o ar da mistura. Após o enchimento do fiambre no saco este é selado através de um sistema de colocação de cliques específicos. Por fim, enformam-se em moldes metálicos e prensam-se estes para de seguida irem para as estufas elétricas.

Na cozedura, a carne passa por uma série de fenómenos físico-químicos, bioquímicos e microbiológicos que vão definir a qualidade do produto, as suas características organolépticas e assegurar a estabilidade microbiológica. Por isso, são definidos temperaturas e tempos no processo de cozedura de forma a garantir a esterilidade do produto final.

O processamento térmico é sucedido por alterações físicas da textura da carne devido à solubilização do colagénio em gelatina, alterações físicas da forma e homogeneidade da carne resultando na ligação da carne, formação de um sabor e aparência únicos e aumentar a estabilidade do produto e tempo de prateleira.

O fiambre deve ser submetido a uma temperatura de 75°C durante cerca de seis horas e meia até o seu interior atingir 72°C de modo a garantir os benefícios inerentes ao tratamento térmico. Nesta

etapa dá-se a coagulação das proteínas musculares formando-se um bloco gelificado, a desnaturação das fibras degradadas durante a massagem favorecendo a sua compactação e formação de uma rede tridimensional capaz de reter água, conferindo ao produto acabado consistência, firmeza e coesão. Desenvolve-se também o aroma e o sabor característicos e a estabilização da cor do produto.

Após a cozedura, o fiambre é arrefecido com um duche de água fria durante cerca de uma hora, com o intuito de reduzir a temperatura interna do produto para os 40 – 50°C. Seguidamente, o produto é encaminhado para uma câmara de refrigeração, onde permanece durante doze horas a cerca de 0°C para diminuir gradualmente a temperatura interna até aos 4°C. Esta temperatura deve ser atingida o mais rápido possível, uma vez que a temperaturas abaixo dos 4°C são eficazes contra microrganismos sobreviventes ao tratamento térmico.

Os produtos nunca devem ser colocados numa câmara de refrigeração sem antes terem passado pelo duche de água fria, dado que a água presente nas camadas mais superficiais do produto iria solidificar, enquanto o interior permaneceria quente, o que levaria à formação de exsudado. O armazenamento do produto é efetuado em câmaras de refrigeração entre os 0 e 5°C.

A cor da carne é influenciada por fatores intrínsecos (pH, potencial de oxidação-redução, atividade enzimática) e extrínsecos (aditivos, acidificação e aquecimento) durante o processamento e alterando o rácio das diferentes formas da mioglobina.¹⁴⁸⁻¹⁵³

2.3 A cor da carne

A mioglobina é uma proteína monomérica globular composta pela proteína globina associada a um grupo heme. Este grupo heme consiste num anel de porfirina condensado com um átomo de ferro (Fe^{2+}). O ferro pode formar seis ligações sendo que quatro dessas ligações ocorrem a átomos de nitrogénio da porfirina, uma outra à globina e a sexta ligação pode ser efetuada com oxigénio, água ou óxido nítrico o que determina o estado de oxidação da mioglobina e conseqüentemente afeta a cor da carne.

A mioglobina pode existir em três formas: desoximioglobina (cor roxa) que é rapidamente oxigenada a oximioglobina (cor vermelha) quando exposta ao ar e metamioglobina (cor acastanhada) que resulta da oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} da mioglobina, que ocorre à medida que a carne vai maturando.

O nitrito é um agente oxidante da mioglobina, provavelmente a reação inicial consiste na conversão da mioglobina e oximioglobina em metamioglobina. O óxido nítrico pode combinar-se com a metamioglobina originando a nitrosometamioglobina, que pode reduzir-se a nitrosomioglobina.

A nitrosomioglobina é originada pela desnaturação da parte protéica da mioglobina, mantendo-se intacta a estrutura do grupo heme com a ligação ao óxido nítrico. A cor do nitroso hemocromo é rosa, em contraste com a nitrosomioglobina que possui uma cor mais avermelhada. O nitroso hemocromo é estável ao calor, porém instável à luz e oxidações.

Contudo, é necessário ter em atenção os limites da adição do nitrito, dado que níveis elevados de nitrito podem resultar num aspeto esverdeado do produto cárneo. Em produtos como o fiambre, o nitrito adicionado é oxidado a nitrato, deixando de atuar no desenvolvimento da cor do produto final.

O pH do músculo está relacionado com o estado bioquímico do mesmo no momento do abate do animal e, após o desenvolvimento do *rigor mortis*, contribuindo para a cor da carne e posteriormente do produto final.

A diminuição do fornecimento de oxigénio decorrente do abate resulta na conversão do glicogénio em ácido láctico e conseqüentemente o pH diminui. Este processo de acidificação muscular inativa as enzimas glicolíticas.

A carne de suíno com pH elevado (pH 6) exposta a tratamento térmico apresenta cor vermelha mais intensa que a carne a pH ligeiramente inferior (pH 5.5) sugerindo que a quantidade de mioglobina desnaturada é reduzida na carne, a pH mais elevado, a uma determinada temperatura.

Trout comprovou que entre 55 e 83°C, a presença de cloreto de sódio e tripolifosfato de sódio aumentam a percentagem de mioglobina desnaturada e concluiu que a cor rosa que se encontra em carne cozinhada com pH elevado está relacionada com a desnaturação incompleta da mioglobina a baixas temperaturas (70°C).

A perda de cor de produtos cárneos é muito influenciada pela luz, pois produtos contendo complexos de óxido nítrico, como é o caso do fiambre, são suscetíveis à fotólise reduzindo a alterando a cor.

O oxigénio permite manter a mioglobina na forma oxigenada – oximioglobina. No entanto, em atmosfera rica em oxigénio existe a promoção da oxidação lipídica desenvolvendo sabores indesejados e diminuindo a consistência do produto cárneo. Por este motivo, deverá ser encontrado um equilíbrio entre o que se pretende a nível sensorial (cor) e a segurança do produto para a saúde humana. A medição e controlo de determinados parâmetros, como pH e temperatura são essenciais para a obtenção do produto pretendido pelo produtor e consumidor com o máximo de segurança.

A importância da cor no aspeto/atratividade dos produtos pelo consumidor, designadamente de produtos cárneos processados, como o caso do fiambre corrente é muito significativa. A estratégia para a obtenção da melhor cor possível deve focar-se, tal como referido anteriormente, no controlo restrito de todos os parâmetros que afetam a qualidade/estabilidade da matéria-prima, assim como na execução e controlo rigoroso de todas as restantes etapas da produção do fiambre.

Devido à composição do fiambre corrente e a todo o seu processamento a cor final não é a mais atrativa. Por outro lado, a legislação portuguesa não permite a utilização de corantes sintéticos (eritrosina, vermelho *allura* AC, carmoisina, vermelho cochineal A, amaranço e vermelho 2G) e mesmo corantes naturais (carmim de cochonilha) no fiambre corrente. Assim, o desafio do presente trabalho consistiu na obtenção de uma cor mais atrativa para este tipo de fiambre, que no caso de ser conseguida seria uma mais-valia para a empresa Primor.

2.4 Plano e objetivos

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de pigmentos rosa/vermelhos a partir de espécies vegetais para aplicação em fiambre corrente de modo a tornar a sua cor/aspeto mais apelativo ao consumidor.

Nesse sentido foram escolhidas as espécies *Raphanus sativus* L. (rabanete) *Roselle sabdariffa* .L. (hibisco), *Beta vulgaris* L. (beterraba) e *Opuntia stricta* (opuntia). Foram obtidos extratos usando diferentes sistemas de solventes, os quais foram parcialmente caracterizados por diferentes técnicas analíticas, designadamente espectroscopia de UV/Visível, e RMN (^1H e ^{13}C), HPLC-DAD e espectrometria de massa. A actividade biológica destes extratos, nomeadamente citotóxica, foi avaliada.

O encapsulamento dos extratos foi realizado em sistema lipídicos e em matrizes de maltodextrinas de modo a melhorar a estabilidade destes pigmentos ao longo do processo de produção do fiambre.

A aplicação dos extratos antes e após encapsulamento foi efetuada na Primor em fiambre corrente, à escala piloto segundo os procedimentos habitualmente usados na empresa na preparação do mesmo.

Estudos colorimétricos das soluções aquosas dos extratos, assim como em amostras de fiambre resultantes da aplicação dos extratos das diferentes espécies, assim como do corante de

cochonilha, como modelo, embora não permitido pela legislação no fiambre, em comparação com o fiambre não tratado foram efetuados.

Foi possível chegar a uma formulação com o extrato de *Beta vulgaris* L. foi o que apresentou no fiambre uma tonalidade aproximada à pretendida e que se apresenta promissora.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Procedimentos gerais

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram determinados no aparelho Bruker Avance III 400 numa frequência de 400 MHz para ^1H e 100,6 MHz para ^{13}C , usando o pico de solvente como referência interna, a 25°C. Os desvios químicos são referidos em ppm, utilizando como referência o valor $\delta_{\text{H Me}_4\text{Si}} = 0$ ppm, e as constantes de acoplamento (J) surgem em Hz. A atribuição dos sinais de ^1H e ^{13}C foi efetuada por comparação dos desvios químicos, multiplicidade dos picos e valores de J . Foram ainda usadas técnicas de desacoplamento de dupla ressonância, assim como de correlação espectroscópica heteronuclear bidimensional, nomeadamente HMQC e HMBC. Os solventes deuterados usados foram dimetilsulfóxido- d_6 e água- d_2 com grau de deuteração superior a 99,8%, da euriso-top® ou da Acros Organics.

Os espectros de ultravioleta/visível (200-800 nm) foram obtidos num espectrofotómetro Shimadzu UV/3101PC ou UV 2501PC (nos ensaios de nanoencapsulamento).

Os espectros de massa de baixa resolução foram efetuados num Finnigan LXQ.

Na liofilização dos extratos usou-se num liofilizador Alpha 1-4 LD Plus – Christ durante 4/5 dias e posteriormente armazenados em exsiccador.

As medições colorimétricas foram efetuadas utilizando o Sistema CIELab (L^* (luminescência), a^* (coloração verde/vermelha) e b^* (coloração azul/amarela)), num colorímetro Konica Minolta Chroma Meter CR-400/410.

Para o encapsulamento foi usado, uma mistura comercial de lípidos, lecitina de soja (Sternchemie) contendo (% mol/mol) 22% de fosfatidilcolina, 20% de fosfatidiletanolamina, 20% defosfatidilinositol e 10% de ácido fosfatídico como componentes principais, com uma concentração de 1×10^{-3} M). Os amicons usados foram Amicon Ultra, Millipore. A maltodextrina (DE20) é uma mistura comercial da Prozis, constituída por maltodextrina e pode conter vestígios de ovo, leite, soja e glúten.

Os reagentes usados foram produtos *p.a.* ou para síntese das empresas Sigma-Aldrich, BDH Chemicals e Acros Organics e os solventes usados foram produtos *p.a.* fornecidos pela Fisher Chemical, Panreac e Carlo Erba.

Os estudos de atividade biológica em células do adenocarcinoma gástrico (AGS) foram efetuados no REQUIMTE, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

As análises de HPLC-DAD foram efetuados no REQUIMTE, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

As análises de UHPLC-ESI-Q-TOF (timsTOF) foram efectuadas na Unidad de Espectrometria de Massa e Proteómica, CACTUS, em Santiago de Compostela, Espanha.

2.2 Obtenção de extratos

2.2.1 Material vegetal

O material vegetal do *Raphanus sativus* L.; *Roselle sabdariffa* L.; *Beta vulgaris* L. e *Opuntia stricta* foram adquiridos comercialmente, nas formas frescas (*Raphanus sativus* L.; *Beta vulgaris* L. e *Opuntia stricta*) e na forma desidratada (*Roselle sabdariffa* L.).

A *Opuntia stricta*, foi colhida e enviada em Maio de 2019 pela empresa Opuntia Farm situada em Portalegre, Portugal.

Foram utilizadas diferentes partes das espécies vegetais selecionadas. A *Beta vulgaris* L. e *Opuntia stricta* foram descascadas e o seu interior foi cortado em pequenos pedaços. O *Raphanus sativus* L. foi descascado e apenas a casca foi utilizada para extração. O *Roselle sabdariffa* L foi utilizado diretamente na forma em que foi adquirido.

2.2.2 Procedimento geral de extração

À matéria vegetal (*Raphanus sativus* L.; *Roselle sabdariffa* L.; *Beta vulgaris* L. e *Opuntia stricta*) foi adicionado o sistema de solventes correspondente na proporção pretendida, sem ou com abrigo de luz (no escuro) e a mistura resultante foi mantida, sem ou com agitação magnética, à temperatura e durante o tempo indicados na Tabela 3.

Após esse período, as misturas foram filtradas, tendo sido descartado o material vegetal e o filtrado foi sujeito a evaporação (com exceção da *Opuntia stricta*) em evaporador rotativo (temperatura do banho a 40°C) de modo a remover os solventes voláteis.

No caso da *Opuntia stricta*, o filtrado foi submetido a centrifugação numa centrífuga Hermle Z300 a 500 rpm durante 16 minutos. A mistura resultante foi evaporada, tal como foi referido anteriormente.

Em seguida, os extratos foram congelados a -80°C e liofilizados no liofilizador Alpha 1-4 LD Plus – Crist durante quatro/cinco dias, resultando nos extratos secos correspondentes que foram armazenados num exsiccador.

Tabela 3. Sistemas de extração realizados no *Raphanus sativus* L.; *Roselle sabdariffa* L.; *Beta vulgaris* L. e *Opuntia stricta*.

Espécie	Ensaio	Sistema de solventes (v/v)	Rácio (g/mL) ^a	Duração (h)	Condições de extracção	Bibliografia ^b
<i>Raphanus sativus</i> L.	1	Água:Ácido acético (95:5)	1:4	18	Escuro 4°C	97
<i>Roselle sabdariffa</i> L.	2	Etanol: Ácido acético (80:20)	1:2	72	Escuro 4°C	123
	3	Água: Etanol: Ácido acético (70:29,7:0,3)	1:2	72	Escuro 4°C	123
<i>Beta vulgaris</i> L.	4	Água	1:3	0,75	Escuro Aquecimento até 100°C	131
	5	Água: Etanol (25:75)	1:25	48	Escuro T.a.	-
	6	Água: Etanol (50:50)	1:2	1,5	Escuro TA Ultrassons	134
	7	Água: Etanol: Ácido Clorídrico (66,6:33:0,33)	1:2	48	Escuro T.a.	68
	8	Água: Etanol: Ácido acético (66,6:33:0,33)	1:2	48	Escuro T.a.	5
<i>Opuntia stricta</i>	9	Água	1:5	2	Escuro T.a. Agitação (200rpm)	69
	10	Etanol: Água (1:1)	1:5	0,33	Escuro T.a. Agitação (200rpm)	93
	11	Água: Etanol: Ácido acético (66,7:33:0,3)	1:5	0,33	Escuro T.a. Agitação (200rpm)	5

^a Rácio de matéria vegetal: solvente; ^b Referências usadas na escolha das condições experimentais dos diferentes ensaios

2.3 Caracterização dos extratos

2.3.1 Estudos de UV/Visível

As propriedades de absorção de radiação UV/Visível dos extratos obtidos de *Raphanus sativus* L.; *Roselle sabdariffa* L.; *Beta vulgaris* L. e *Opuntia stricta* foram determinadas após extração, diretamente no sistema de solventes, (0,2 mL) diluindo em água (2,8 mL) e após liofilização por dissolução do extrato sólido (4-6 mg) em água (3 mL).

Pela aplicação da equação 1 e 2 aos resultados de absorvância foram calculadas as quantidades de antocianinas e betalainas presentes nos extratos obtidos, respectivamente.

Quantificação das antocianinas

A quantificação total de antocianinas (QA) nos extratos de *Raphanus sativus* L. e *Roselle sabdariffa* L. foi calculada usando as equações 1:^{98,123} $QA \text{ (mg/L)} = (A \times FD \times Mr \times 1000) / \epsilon \times l$ (1), onde A é a absorvância máxima corrigida pela absorção a 600 nm sendo 512 nm (*Raphanus sativus* L.) e 519 nm (*Roselle sabdariffa* L.), FD é o fator de diluição e l é a distância percorrida da radiação através da cuvete (1 cm). Foram usados os valores de massa molecular (Mr) e coeficiente de extinção molar (ϵ) da pelargonidina-3-glucósido pertencente ao *Raphanus sativus* L. (Mr = 433,2 g/mol; ϵ = 31600 L/mol cm) e da cianidina-3-sambubiósido do *Roselle sabdariffa* L. (Mr = 449,2 g/mol; ϵ = 26900 L/mol cm).

Quantificação das betalainas

A quantidade de betalainas (QB) nos extratos de *Beta vulgaris* L. e *Opuntia stricta* foi calculada usando a equação 2:^{89,154} $QB \text{ (mg/L)} = (A \times FD \times Mr \times 1000) / \epsilon \times l$ (1), onde A é a absorvância máxima corrigida pela absorção a 600 nm, FD é o fator de diluição e l é a distância percorrida da radiação através da cuvete (1 cm). Para a quantificação das betacianinas e betaxantinas, foram usados os valores das massas moleculares (Mr) e coeficientes moleculares (ϵ) da betanina (Mr = 550 g/mol; ϵ = 60000 L/mol cm em água; λ = 538 nm), e da indicaxantina (Mr = 308 g/mol; ϵ = 48000 L/mol cm em água; λ = 480 nm),

2.4 Estudos de nanoencapsulamento

2.4.1 Nanoencapsulamento em lipossomas

Para os estudos de nanoencapsulamento em lipossomas foram usados os extratos de *Raphanus sativus* L.; *Roselle sabdariffa* L.; *Beta vulgaris* L. e *Opuntia stricta* liofilizados.

Foram realizadas diluições de concentrações 2×10^{-5} - 50×10^{-4} mg/mL para calcular a curva de calibração e determinação da eficiência de encapsulamento.

Os lipossomas foram preparados pelo método de injeção etanólica e hidratação lipídica usando uma mistura comercial de lípidos, lecitina de soja (Sternchemie) contendo (% mol/mol) 22% de fosfatidilcolina, 20% de fosfatidiletanolamina, 20% de fosfatidilinositol e 10% de ácido fosfatídico como componentes principais, com uma concentração de 1×10^{-3} M. No método de injeção etanólica foi adicionado 2×10^{-3} g/mL de extrato à mistura lipídica e em bomba de nitrogénio foi evaporado o solvente. Após a evaporação, adicionou-se cerca de 0,75 μ L de tetrahidrofurano (TFH) e 0,75 μ L de etanol. Sob vórtex adicionou-se a mistura a 3 mL de água destilada e a solução resultante foi colocada em tubos Amicon e centrifugada (Universal 320 Hettich Zentrifugen) durante 10 minutos a 3000 rpm.¹⁵⁵

Para a hidratação lipídica foi adicionada lecitina de soja (60×10^{-3} g) a etanol (3 mL) e evaporada a mistura na bomba de nitrogénio. Foi adicionado à mistura lipídica 10×10^{-3} g/mL da solução aquosa de extrato, anteriormente dissolvida em 5 mL de água destilada. Esta solução foi colocada no vórtex durante 5 minutos e no sonicador (Misonix) também durante 5 minutos. Em seguida, a mistura resultante foi centrifugada em tubos Amicon durante 10 minutos a 3000 rpm.¹⁵⁶

Desta centrifugação resultou uma fração encapsulada (retida no filtro do Amicon) e outra não-encapsulada (sobrenadante). Ambas as frações foram recolhidas e com o auxílio do espectrofotómetro UV-Visível (Shimadzu UV-3600 Plus) foram obtidos espectros de absorção.

A absorvância das frações foi medida e as concentrações dos pigmentos encapsulados e não encapsulados foram determinados pela lei de Beer-Lamber (3)) e pela curva de calibração anteriormente obtida.

$$A = \varepsilon \times l \times c \quad (3)$$

A eficiência de encapsulamento, EE (%), foi calculada pela equação abaixo:¹⁵⁵

$$EE (\%) = \frac{\text{Quantidade total} - \text{Quantidade não encapsulada}}{\text{Quantidade total}} \times 100 \quad (4)$$

2.4.2 Nanoencapsulamento em maltodextrina (DE20)

Para os estudos de nanoencapsulamento em maltodextrina (DE20) foram usados os extratos de *Raphanus sativus* L.; *Roselle sabdariffa* L.; *Beta vulgaris* L. e *Opuntia stricta*.

Foi adicionada extrato liofilizado (0,5 g) a água destilada (3 mL) e posteriormente, sob agitação, adicionou-se maltodextrina (3 g). A mistura resultante foi centrifugada (Hemle Z-300) a 500 rpm durante 16 minutos e posteriormente submetida a liofilização e com base na massa final obtida foi calculado o rendimento de encapsulamento¹⁵⁴.

$$\text{Rendimento de encapsulamento (\%)} = \frac{\text{massa final após liofilização}}{\text{massa inicial (maltodextrina+ extrato)}} \times 100 \quad (5)$$

2.5 Aplicação dos extratos no fiambre

Foram pesados os ingredientes que compõem a salmoura e as diferentes carnes a incorporar o fiambre. Preparou-se a salmoura e adicionou-se o extrato escolhido. Efetuou-se a medição da temperatura e pH da mistura resultante. Posteriormente adicionou-se a carne e com a ajuda de um robô de cozinha (Yammi) envolveu-se a mistura de forma a torná-la homogênea.

De seguida, procedeu-se ao embalamento da mistura resultante em tripa de plástico e enformou-se em recipientes metálicos, tendo sido mantida em repouso durante 12 horas a 4°C.

Após o repouso procedeu-se ao cozimento da pasta a 75°C, o qual fica completo quando o núcleo atinge os 72°C. Nessa altura colocou-se o fiambre rapidamente em gelo de modo a atingir rapidamente os 4°C e reservou-se a baixas temperaturas (5°C) durante 24 horas. No final deste período desenformou-se o fiambre e colocou-se no frio a 4°C até ser utilizado nos ensaios colorimétricos.

2.6 Análise colorimétrica

A cor foi analisada usando o sistema CIELab. Os valores parâmetros da cor, designadamente L* (luminosidade), a* (coordenada verde *versus* vermelho; +a indica vermelho e -a indica verde) e b* (coordenada azul *versus* amarelo; +b indica amarelo e -b indica azul) foram determinados num bloco de calibração branco usando um Konica Minolta Chroma Meter CR-400/410.

As amostras dos extratos liofilizados (8 mg) foram analisadas em solução aquosa (8 mL), de concentração 1 mg/mL.

As amostras de fiambre, sem e com adição de extratos na formulação usada na sua preparação, foram cortadas em fatias de cerca de 1,5 mm.

As medições das cores foram efetuadas numa placa de Petri transparente (5 cm²), para onde foram transferidas as soluções, ou a fatia de fiambre a analisar. Cada amostra foi analisada em cinco pontos distintos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção das espécies vegetais

De modo a tornar o fiambre da perna um produto cárneo mais apelativo ao consumidor, são necessárias melhorias, ao nível da coloração, que resultem na obtenção de um produto final com uma cor mais rosada.

O carmim de cochonilha é um corante que existe no mercado capaz de conferir cor rosada aos produtos onde é adicionado. Contudo, no seguimento da legislação portuguesa, este não pode ser aplicado ao fiambre da perna. Em alternativa a este corante, o uso de um corante natural que preencha os requisitos necessários para a aplicação em causa surge como um tópico interessante e atual.

Na natureza existem diversos pigmentos de colorações muito variadas, contudo, para a obtenção da cor pretendida são desejáveis os pigmentos vermelhos/rosados, designadamente da classe das antocianinas e betalainas.

Para este projeto, e na procura de fontes naturais de pigmento vermelhos/rosas foram escolhidos o *Raphanus sativus* L. (rabanete), *Roselle sabdariffa* L. (hibisco), *Beta vulgaris* L. (beterraba) e *Opuntia stricta* (opuntia). Como referido anteriormente, os pigmentos vermelho/rosa que entram na composição do *Raphanus sativus* L. e *Roselle sabdariffa* L. são antocianinas e na *Beta vulgaris* L. e *Opuntia stricta* são betalainas. Especificamente, destacam-se no *Raphanus sativus* L. a pelargonidina e no *Roselle sabdariffa* L. a cianidina e delfinidina. Na *Beta vulgaris* L. e *Opuntia stricta* é referida a presença de betanina, isobetanina e vulgaxantina (I e II).

3.2 Obtenção de extratos

A extração dos pigmentos a partir das fontes naturais efetuada neste trabalho teve por base estudos reportados na literatura, designadamente relativos ao método, sistemas de solventes e outras condições experimentais aplicadas. Para além disso, foi também tida em conta a legislação em vigor de modo que todo o processo fosse seja concordante e dentro do que é permitido para a indústria alimentar.

Para a obtenção de extrato de *Raphanus sativus* L. foi utilizada este vegetal fresco e apenas a sua casca foi colocada em contato com o solvente. A extração de pigmentos foi realizada com água destilada acidificada com ácido acético (95:5; v/v) a 4°C, na ausência de luz durante 18 horas. Estas condições experimentais usadas são suportadas pela literatura, que menciona a natureza instável das

antocianinas a valores de pH neutros e/ou básicos, assim como, a instabilidade destes pigmentos à temperatura e luz.

Relativamente ao extrato de *Roselle sabdariffa* L., este resultou da adição do mesmo desidratado de uma solução de etanol e ácido acético (80:20; v/v) ou de solução aquosa de etanol acidificado com ácido acético (70:29,7:0,3; v/v). A extração decorreu a 4°C, na ausência de luz e durante 72 horas. Na obtenção deste extrato e, dado que contém pigmentos da mesma classe que o anterior, foram tidos em consideração os mesmos parâmetros, nomeadamente o pH, dado que as antocianinas presentes são estáveis e existem nesta flor em pH ácido

No caso da *Beta vulgaris* L., para a obtenção dos extratos foram testados vários sistemas de solventes, tendo sido também variadas as restantes condições experimentais, dado que os pigmentos presentes na sua composição, as betalainas apresentam uma maior estabilidade à temperatura comparativamente às antocianinas obtidas neste trabalho a partir do *Raphanus sativus* L. e *Roselle sabdariffa* L., como referido anteriormente. Assim, a *Beta vulgaris* L. descascada e cortada em pequenos pedaços, foi inicialmente submetida à extração com água destilada e a mistura na ausência de luz, foi aquecida até aos 100°C. Atingida essa temperatura, o correspondeu a aproximadamente 45 minutos, o ensaio foi interrompido. A cor do extrato resultante deste ensaio, após um determinado período de tempo, alterou-se, pelo que o mesmo foi rejeitado.

Em seguida, foi efetuado outro ensaio utilizando uma solução de água e etanol (25:75; v/v), ao abrigo da luz, à temperatura ambiente, durante 48 horas. Posteriormente, usando novamente o sistema de solventes água/etanol (50:50; v/v), mas aumentando a quantidade de água, decidiu-se usar o ultrassons (J. P. Selecta), à temperatura ambiente, tendo sido a mistura sonicada durante 90 minutos. A utilização de sistemas de extração ácidos foi também considerada, tendo sido usada num dos ensaios uma solução aquosa de etanol com adição de ácido clorídrico (66,6:33:0,33; v/v) e no outro ensaio a acidificação ocorreu com ácido acético, tendo ambos os ensaios sido mantidos ao abrigo da luz, à temperatura ambiente, durante 48h.

Para a extração de betacianinas da *Opuntia stricta*, os ensaios decorreram à temperatura ambiente e na ausência de luz, de modo a potenciar a estabilidade destes pigmentos no extrato resultante. Assim, os extratos foram obtidos a partir do fruto descascado, usando como sistemas de solventes, num primeiro ensaio apenas água destilada, com agitação durante 2 horas e nos outros dois ensaios soluções de água/etanol (1:1; v/v) sem ou com adição de ácido acético (66,7:33:0,3; v/v), e agitação por 20 minutos em ambos os casos.

O rácio material vegetal/solvente [m (g)/v (mL)] variou de 1:25 a 1:50, tal como indicado na Tabela 3.

Após remoção do material vegetal, as soluções resultantes dos processos de extração do *Raphanus sativus* L., *Roselle sabdariffa* L. e *Beta vulgaris* L. com os diferentes sistemas de solventes, foram submetidas a evaporação parcial (com exceção dos casos em que foi usada apenas água) sob pressão reduzida, de modo à remoção dos solventes mais voláteis. No caso da *Opuntia stricta*, a evaporação ocorreu apenas após centrifugação. Posteriormente, as soluções foram congeladas a -80°C e liofilizadas originando os respetivos extratos sólidos.

As percentagens da massa de extrato em função da massa de matéria vegetal de partida variaram nas diferentes espécies/condições experimentais usadas (Tabela 3), tendo sido obtido valores máximos entre aproximadamente 4 e 35%; *Raphanus sativus* L. (3,6%), *Roselle sabdariffa* L. (35%), *Beta vulgaris* L. (8,7%) e *Opuntia stricta* (7,0%) (Tabela 4).

Os extratos obtidos após remoção da matéria vegetal sólida e soluções aquosas obtidas com os extratos liofilizados foram submetidos a estudos preliminares de estabilidade a diferentes parâmetros físico-químicos (pH, temperatura e exposição à radiação), tendo os resultados obtidos sido considerados ao longo deste trabalho nos diferentes estudos efetuados.

Tabela 4. Percentagens mássicas de extrato liofilizado obtidas para o *Raphanus sativus* L., *Roselle sabdariffa* L., *Beta vulgaris* L. e *Opuntia stricta* nos ensaios 1, 3, 8 e 11 indicados na Tabela 3.

Espécie	Ensaio	% Mássico (m/m)
<i>Raphanus sativus</i> L.	1	3,6
<i>Roselle sabdariffa</i> L.	3	35
<i>Beta vulgaris</i> L.	8	8,7
<i>Opuntia stricta</i>	11	7

Os extratos obtidos foram parcialmente caracterizados por diferentes técnicas analíticas, designadamente espetroscopia de UV-visível, RMN, HPLC-DAD e espetrometria de massa de baixa e alta resolução.

Os extratos liofilizados das espécies foram usados em estudos de nanoencapsulamento com diferentes sistemas lipídicos, designadamente lipossomas e maltodextrina (DE20) e determinadas eficiências/rendimentos de encapsulamento.

Foram também submetidos a estudos de citotoxicidade em células do adenocarcinoma do estômago (AGS), através de uma colaboração existente no âmbito do projeto de investigação em que se insere este trabalho.

Atendendo ao objectivo final desta dissertação, os extratos sólidos foram usados na preparação de fiambre da perna, em estudos efetuados na empresa Primor. Amostras do fiambre obtido com os extratos das diferentes espécies foram avaliadas relativamente à coloração obtida por observação visual direta e análise colorimétrica usando o sistema CIELab, em comparação com as correspondentes soluções aquosas obtidas por dissolução dos sólidos usados nesses ensaios apenas em água.

3.3 Caraterização dos extratos

3.3.1 Estudos de absorção de UV/Visível

As soluções obtidas após remoção da matéria vegetal, diluídas com água destilada (0,2:2,8; v/v)), assim como as soluções aquosas preparadas a partir dos extratos sólidos liofilizados, foram analisadas por espectroscopia de UV-Visível. Os espectros obtidos são apresentados e discutidos em seguida.

Raphanus sativus L.

O espectro de absorção do extrato de *Raphanus sativus* L. após remoção do material vegetal e diluição com água destilada (0,2:2,8 v/v; pH 2,32) (Figura 10 **A**), apresenta na região do visível uma banda com um máximo de absorção a 507 nm, o que é coincidente com o que é mencionado na literatura, correspondente à presença de pigmentos de antocianinas.^{37,96}

No espectro da solução aquosa preparada a partir do extrato de *Raphanus sativus* L. sólido liofilizado (concentração $1,67 \times 10^3$ g/mL) surge igualmente uma banda com absorção máxima a 507 nm, no entanto, menos estruturada que no espectro anteriormente referido (Figura 10 **B**).

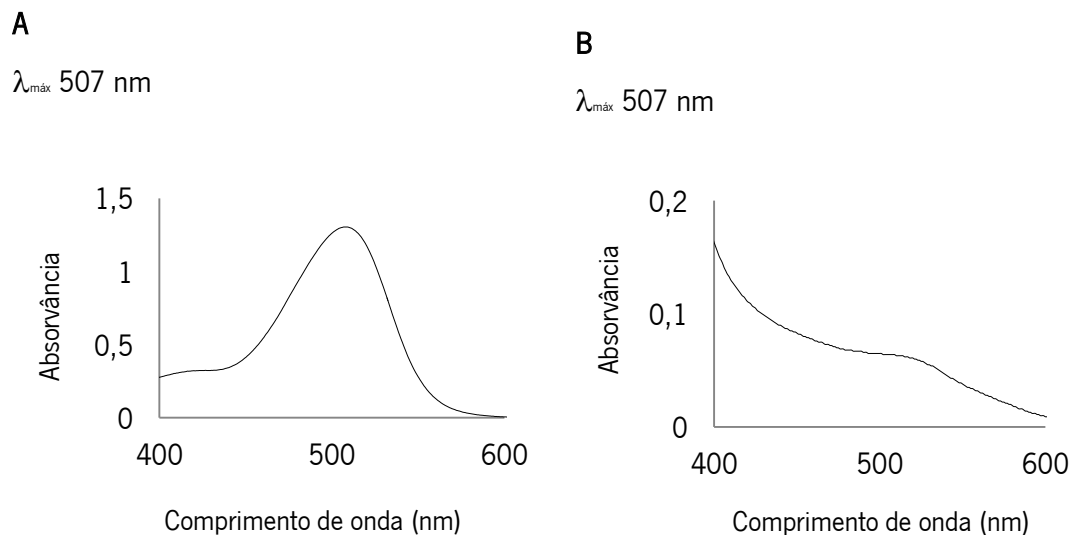


Figura 10. Espectros de absorção do extrato de *Raphanus sativus* L. após remoção do material vegetal e diluição com água destilada (0,2:2,8; v/v) (**A**) e solução aquosa preparada a partir do extrato sólido liofilizado (concentração $1,47 \times 10^{-3}$ g/mL) (**B**)

Atendendo a que os extratos eram para incorporação no fiambre da perna e que a preparação do mesmo se inicia com a preparação da salmoura, onde os extratos seriam adicionados, foram efetuados ensaios preliminares que consistiram na adição das soluções de extrato obtidas após a remoção do material vegetal e por adição do extrato sólido resultante da liofilização a salmoura obtida diretamente da empresa Primor e com a mesma composição a usar nos ensaios posteriores com fiambre.

A Figura 11 mostra para o caso do *Raphanus sativus* L. a comparação das cores da solução de extrato obtida após remoção do material vegetal (**A**) e da salmoura após a adição desse extrato (**B**), assim como do extrato sólido decorrente da liofilização (**C**).

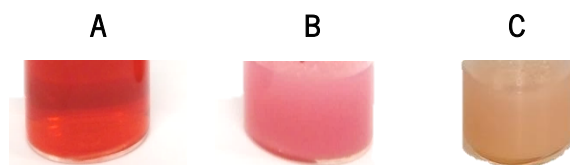


Figura 11. Solução de extrato de *Raphanus sativus* L. após a remoção do material vegetal (**A**) e adição à salmoura (**B**). Adição do extrato sólido resultante da liofilização à salmoura (**C**).

Por comparação visual, verifica-se que as cores obtidas na salmoura são diferentes nas duas situações, o que poderá estar relacionado com a variação do pH, que é de aproximadamente 5,8 na salmoura e com a presença de vários componentes nesta mistura.

Roselle sabdariffa L.

O espectros de absorção dos extratos de *Roselle sabdariffa* L. após remoção do material vegetal e diluição com água destilada (0,2:2,8 v/v; aproximadamente pH 1,6 para ambas as soluções) (Figura 12 **A** e **B**), apresentam na região do visível uma banda com um máximo de absorção a 531-542 nm (ensaios 2 e 3, Tabela 3). Atendendo a que se partiu da mesma quantidade de matéria vegetal e rácio matéria vegetal/solvente (m/v), o valor da absorvância máxima obtido é superior no sistema água/etanol/ácido acético (70:29,7:0,3; v/v), pelo que se decidiu usar o extrato sólido resultante da liofilização com esta composição de solventes nos estudos posteriores com fiambre.

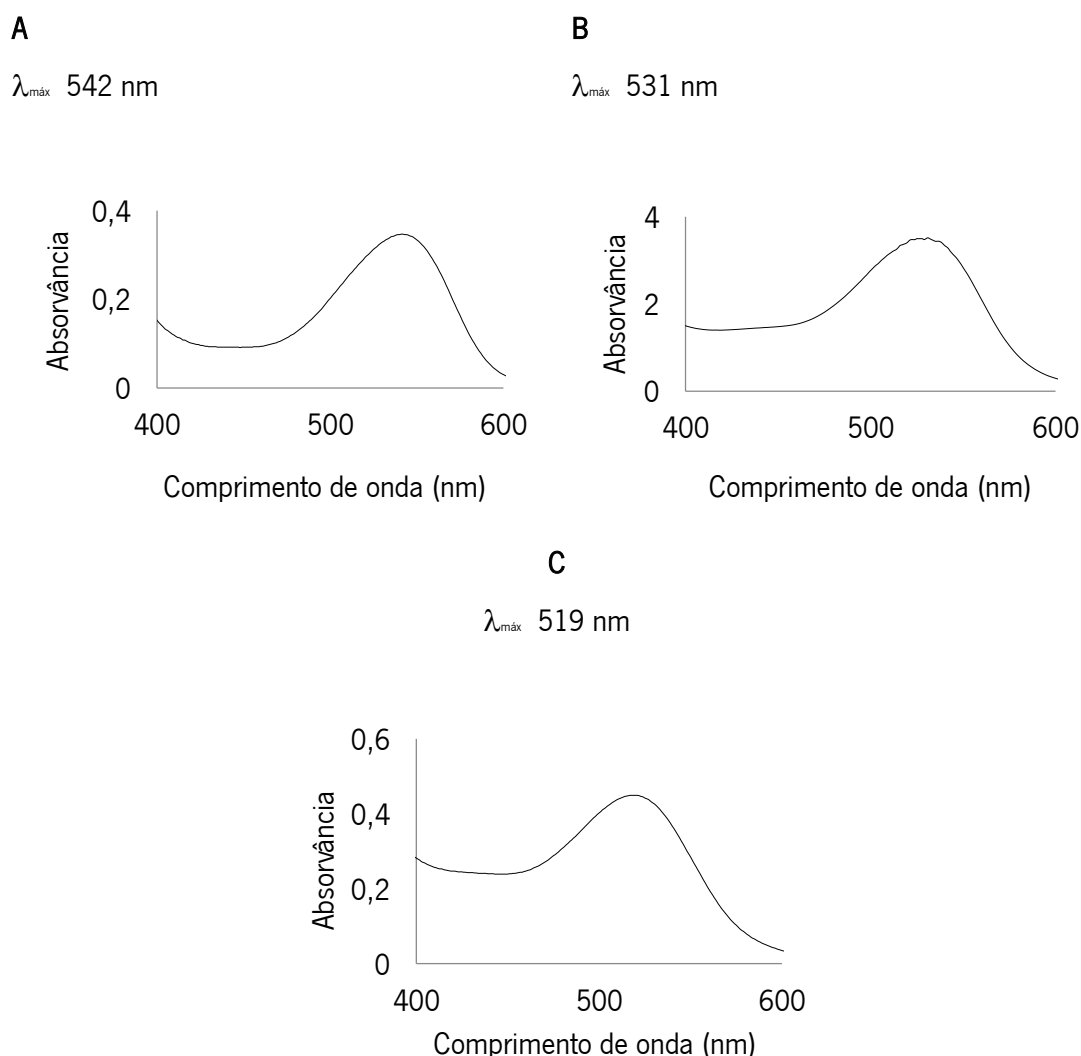


Figura 12. Espectros de absorção dos extratos de *Roselle sabdariffa* L. após remoção do material vegetal e diluição com água destilada (0,2:2,8; v/v) correspondentes aos ensaios 2 (**A**) e 3 (**B**) da Tabela 3 e solução aquosa preparada a partir do extrato sólido liofilizado correspondente ao ensaio 3 (**C**) (concentração $1,73 \times 10^{-3}$ g/mL).

O espectro de UV/Visível da solução aquosa preparada a partir desse extrato sólido liofilizado (concentração $1,67 \times 10^{-3}$ g/mL), mostra que o comprimento de onda de absorção máxima se desviou hipsocromicamente para 519 nm (Figura 12 C), o que resultou da alteração do solvente e pH devidos à liofilização e posterior dissolução apenas em água destilada (pH cerca de 5.5). O valor assim obtido vai de encontro ao que é mencionado na literatura relativamente ao comprimento de onda de absorção máxima característico das antocianinas presentes no hibisco.^{116,123}



Figura 13. Soluções de extrato de *Roselle sabdariffa* L. após a remoção do material vegetal, relativas aos ensaios 2 e 3 (Tabela 3) (A, B) e adição de ambos à salmoura (C, D). Adição do extrato sólido resultante da liofilização da solução do ensaio 3 à salmoura (E)

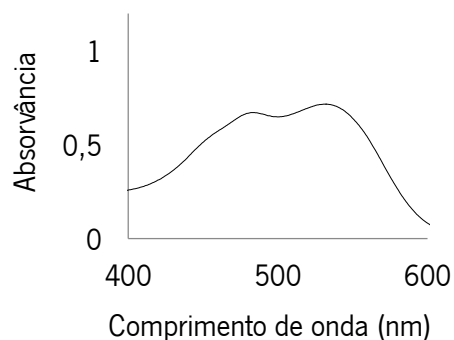
Por comparação visual, verifica-se que a cor obtida na salmoura com o sistema água/etanol/ácido acético (70:29,7:0,3; v/v) (Figura 13 E) é a mais intensa. A adição à salmoura do extrato sólido obtido por liofilização dessa mesma solução resultou num tom rosado diferente.

Beta vulgaris L.

A Figura 14 mostra os espectros de absorção dos extratos de *Beta vulgaris* L. após remoção do material vegetal e diluição com água destilada (0,2:2,8 v/v) dos cinco ensaios efetuados, com os diferentes sistemas de solventes, designadamente água (ensaio 4 da Tabela 3, A), água/etanol 25:75 (ensaio 5 da Tabela 3, B), água/etanol 50:50 (ensaio 6 da Tabela 3, C), água/etanol/ácido clorídrico 66,6:33:0,33 (ensaio 7 da Tabela 3, D) e água/etanol/ácido acético 66,6:33:0,33 (ensaio 8 da Tabela 3, E). Da observação desses espectros é possível verificar a presença de bandas com máximos de absorção na região 531-537 nm, que sugerem a presença de betacianinas, a 478- 485 nm indicadores da presença de betaxantinas e 257-268 nm referentes ao L-leucodopacromo (não mostrado no gráfico correspondente). Atendendo a que se partiu da mesma quantidade de matéria vegetal e rácio matéria vegetal/solvente (m/v) (com exceção do ensaio 5 em que o valor foi ligeiramente superior), o valor da absorvância máxima obtida é superior no sistema água/etanol/ácido acético (66,6:33:0,33; v/v), pelo que se decidiu usar o extrato sólido resultante da liofilização com esta composição de solventes nos estudos posteriores com fiambre (Figura 14 F).

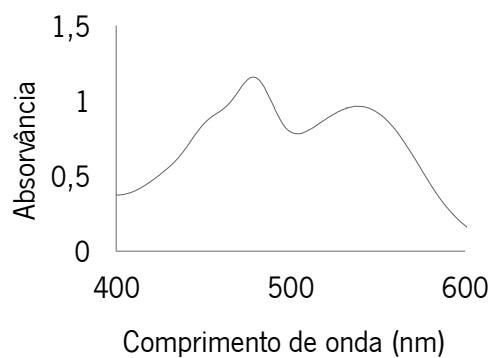
A

$\lambda_{\text{máx}}$ 483, 531 nm



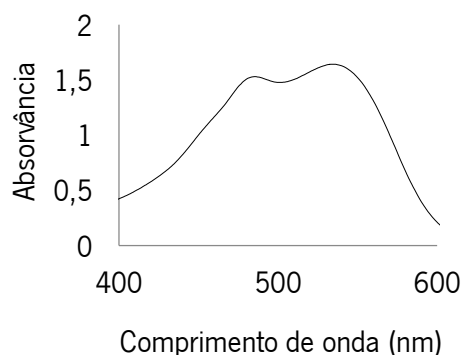
B

$\lambda_{\text{máx}}$ 485, 534 nm



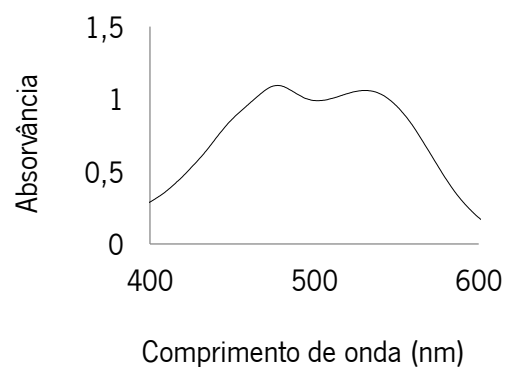
C

$\lambda_{\text{máx}}$ 485, 534 nm



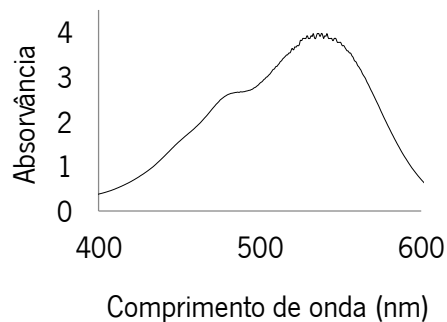
D

$\lambda_{\text{máx}}$ 478, 531 nm



E

$\lambda_{\text{máx}}$ 486, 539 nm



F

$\lambda_{\text{máx}}$ 537 nm

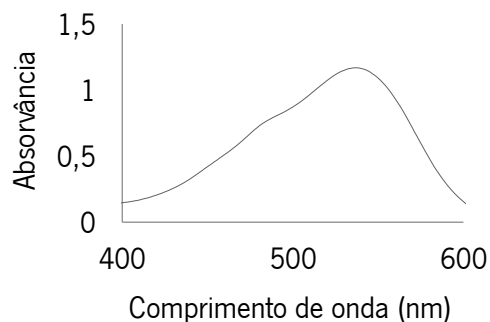


Figura 14. Espectros de absorção dos extratos de *Beta vulgaris* L. após remoção do material vegetal e diluição com água destilada (0,2:2,8; v/v) correspondentes aos ensaios 4 (A), 5 (B), 6 (C) e 7 (D) e 8 (E) da Tabela 3 e solução aquosa preparada a partir do extrato sólido liofilizado correspondente ao ensaio 8 (F) (concentração $2,07 \times 10^{-3}$ g/mL).

A Figura 15 mostra para o caso da *Beta vulgaris* L. a comparação das cores das soluções de extrato obtidas após remoção do material vegetal nos cinco sistemas de solventes usados (ensaios 4-8 Tabela 1) e da salmoura após a adição do extrato 8 (Tabela 1) (F), assim como do extrato sólido decorrente da liofilização da solução obtida do ensaio 8 (Tabela 1) (G).

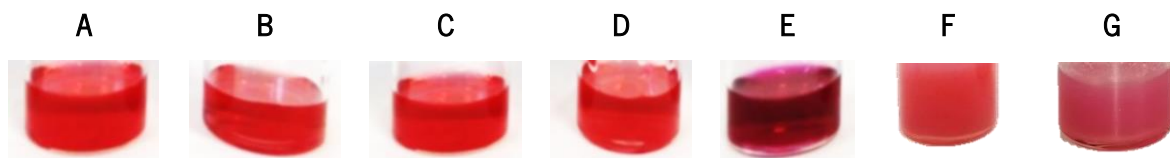


Figura 15. Soluções de extrato de *Beta vulgaris* L. após a remoção do material vegetal, relativas aos ensaios 4 (A), 5 (B), 6 (C) e 7 (D) e 8 (E) (Tabela 3) e adição à salmoura do extrato 8 (F). Adição do extrato sólido resultante da liofilização da solução do ensaio 8 à salmoura (G).

Por comparação visual, verifica-se que a cor obtida no extrato E é a mais intensa e que a adição à salmoura desse extrato, assim como do sólido correspondente obtido por liofilização dessa mesma solução resultou num tom rosado com interesse para a aplicação no fiambre que se pretende efetuar.

Opuntia stricta

A Figura 14 mostra os espectros de absorção dos extratos de *Opuntia stricta* após remoção do material vegetal e diluição com água destilada (0,2:2,8 v/v) dos três ensaios efetuados, com os diferentes sistemas de solventes, designadamente água (ensaio 9 da Tabela 3, A), solução aquosa de etanol (50:50; v/v) (ensaio 3 da Tabela 3, B), água/etanol/ácido acético (66,7:33:0,3; v/v) (ensaio 3 da Tabela 3, C).

Da observação desses espectros é possível verificar que são todos muito semelhantes, apresentando bandas com máximos de absorção na região 536-538 nm, que sugerem a presença de betacianinas. Atendendo a que se partiu da mesma quantidade de matéria vegetal e rácio matéria vegetal/solvente (m/v), o valor da absorvância máxima obtida é superior no sistema água/etanol/ácido acético (66,7:33:0,3; v/v), pelo que se decidiu usar o extrato sólido resultante da liofilização com esta composição de solventes nos estudos posteriores com fiambre (Figura 16 C). Por outro lado, a literatura refere que a estabilidade das betacianinas é superior a valores de pH ácidos, assim a presença de ácido acético no solvente de extração que confere um valor mais baixo ao pH (pH 3,97)

comparativamente aos outros dois sistemas (pH 5,32 e 5,97 para a água e etanol/água 50:50, respectivamente) é benéfico para este tipo de pigmentos.

A solução aquosa obtida a partir do extrato liofilizado apresenta um espectro com um comprimento de onda de absorção máxima a 537 nm, muito semelhante ao espectro do extrato correspondente após a remoção da matéria vegetal da mistura de extração correspondente.

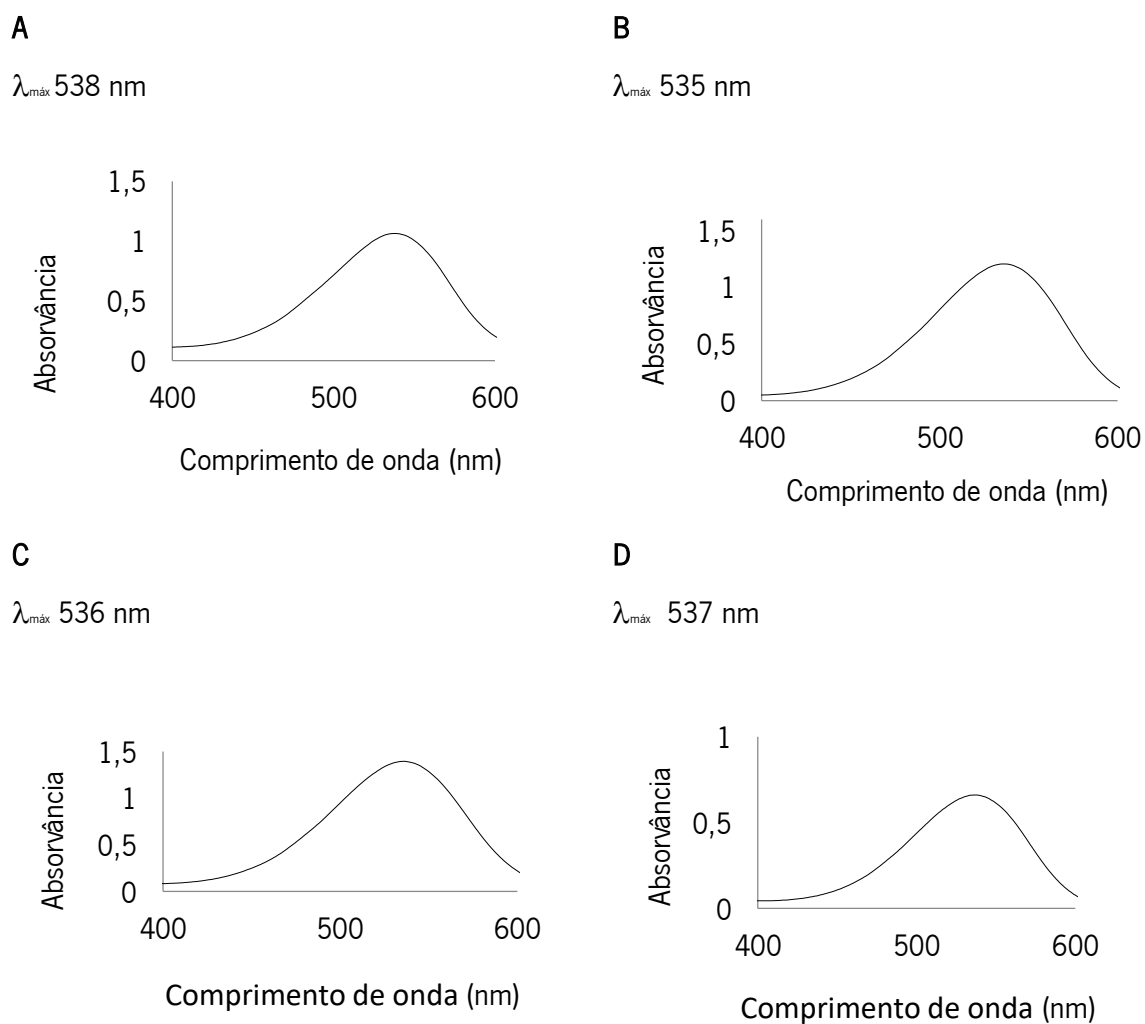


Figura 16. Espectros de absorção dos extratos de *Opuntia stricta* após remoção do material vegetal e diluição com água destilada (0,2:2,8; v/v) correspondentes aos ensaios 9 (A), 10 (B) e 11 (C) da Tabela 3 e solução aquosa preparada a partir do extrato sólido liofilizado correspondente ao ensaio 11 (D) (concentração $1,37 \times 10^{-3}$ g/mL).

A Figura 17 mostra a comparação das cores das soluções de extrato de *Opuntia stricta* obtidas após remoção do material vegetal nos três sistemas de solventes usados (ensaios 9-11, Tabela 3, A, B, C) e da salmoura após a adição desses extractos (D, E, F), assim como do extrato sólido decorrente da liofilização da solução obtida do ensaio (G)



Figura 17. Soluções de extrato de *Opuntia stricta* após a remoção do material vegetal, relativas aos ensaios 9 (A), 10 (B), 11 (C) (Tabela 3) e adição à salmoura dos extratos 9 (D), 10 (E) e 11 (F). Adição do extrato sólido resultante da liofilização da solução do ensaio 11 à salmoura (G).

Por comparação visual, verifica-se que as cores obtidas por adição à salmoura dos três extratos (C, D, E) e do sólido correspondente ao ensaio 11 (F) obtido por liofilização dessa mesma solução não apresentam diferenças significativas, o que é concordante com a semelhança registada nos espectros de absorção. No entanto, no caso do extrato obtido com água a cor é menos intensa do que nos restantes dois, o que sugere uma menor quantidade de betacianinas presentes. Globalmente, a adição do sólido correspondente ao ensaio 11 (F) à salmoura resulta numa cor rosada muito interessante para a aplicação no fiambre que se pretende.

Quantificação dos pigmentos presentes nos extratos

Com base nos dados de UV-Visível e por aplicação das equações 1 e 2, foi possível estimar para os extratos (soluções aquosas preparadas a partir dos extratos sólidos liofilizados) a quantidade de pigmentos. Assim, para os extratos de *Raphanus sativus* L. e *Roselle sabdariffa* L. foram quantificadas as antocianinas, para *Beta vulgaris* L. e *Opuntia stricta* as betalainas (betacianinas e betaxantinas) (Tabela 5).

Tabela 5. Quantidade de antocianinas e betalainas presentes nos extratos liofilizados

Espécie	Ensaio	Pigmento	Quantidade de pigmento (g/L)
<i>Raphanus sativus</i> L.	1	Antocianinas	1,27
<i>Roselle sabdariffa</i> L.	3	Antocianinas	13,01
<i>Beta vulgaris</i> L.	8	Betaxantinas	9,63
	8	Betacianinas	22,13
<i>Opuntia stricta</i>	11	Betaxantinas	2,37
	11	Betacianinas	8,28

Os valores obtidos para as antocianinas variam de 1,27 e 13,01 g/L

No caso das betalaínas, designadamente as betacianinas variaram entre 8,28 e 22,13 g/L e as betaxantina entre 2,37 e 9,63 g/L

Atendendo ao objectivo final deste trabalho, é desejável a presença de betacianinas em maior quantidade do que betaxantinas, dado que as primeiras conferem a cor rosa cor desejada no fiambre, enquanto as segundas conferem a cor amarelo.

3.3.2 Estudos por outras técnicas analíticas

Para além dos estudos por espectroscopia de UV/Visível, os extratos liofilizados foram também submetidos a outras técnicas analíticas, designadamente RMN (1H e 13C), HPLC-DAD e espectrometria de massa de baixa e elevada resolução.

Os espectros de RMN de protão obtidos nos solventes deuterados dimetilsulfóxido e água, mostraram que os extratos das quatro espécies apresentavam uma mistura de diferentes componentes, não tendo sido possível identificar um componente em particular por esta técnica, pelo que os espectros se revelaram inconclusivos relativamente às estruturas dos pigmentos presentes.

Foram realizados estudos por HPLC-DAD que confirmaram no caso do extrato de *Raphanus sativus* L. a presença de derivados de pelargonidina, flavonóides, ácidos e outros componentes, no *Roselle sabdariffa* L. a presença de antocianinas, flavonóides, ácidos e outros componentes e na *Beta vulgaris* L. a presença de betalaínas.

Por espectrometria de massa (ESI) de baixa resolução foi possível confirmar na *Beta vulgaris* L. a presença da betanina, com m/z 550,78 (ião molecular, pico base), tal como mencionado na literatura para esta espécie. No caso do *Raphanus sativus* L., a análise UHPLC ESI-Q-TOF-MME revelou a presença de derivados da pelargonidina 3 mono- ou diglucosilados nas posições 3 e 5, designadamente os compostos **28**, **29** e **30** (Figura 18)⁹⁷, através dos picos a m/z 1019,2666 (valor calculado para C₄₆H₅₁O₂₆ [M⁺] 1019,2663), 989,2559 (valor calculado para C₄₅H₄₉O₂₅ [M⁺] 989,2557) e 433,1132 (valor calculado para C₂₁H₂₁O₁₀ [M⁺] 433,1129).

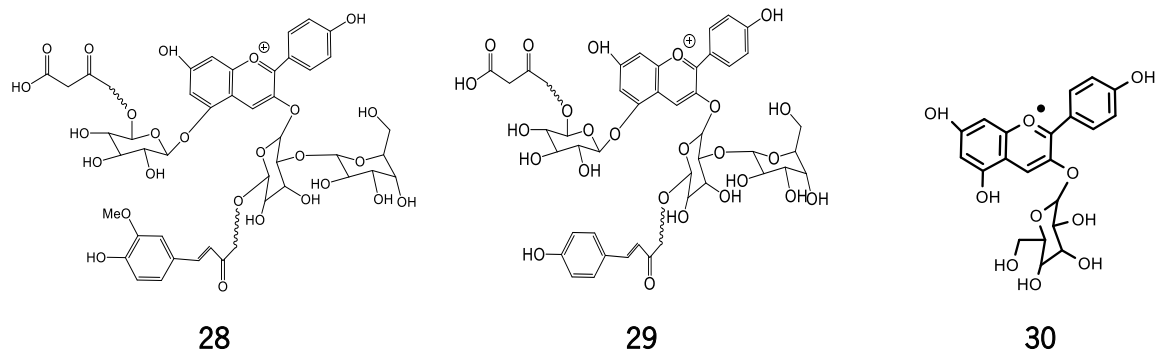


Figura 18. Possíveis estruturas de derivados da pelargonidina **3** presentes no extrato de *Raphanus sativus* L. **28-30**.

3.4 Nanoencapsulamento

O processo de preparação do fiambre envolve a mistura de diferentes aditivos e tratamentos com temperatura e pH ácido, que podem provocar alterações a nível estrutural dos pigmentos usados e consequentemente da coloração obtida com os mesmos.

Atendendo a que as antocianinas e betalainas são sensíveis a determinadas condições (pH, temperatura e luz, entre outros), e considerando a sua utilização na coloração do fiambre nos ensaios a efetuar, decidiu-se proceder ao nanoencapsulamento dos extratos obtidos. Nesse sentido, foram utilizadas matrizes de lecitina de soja (lipossomas) e maltodextrina (DE20), dado que estes sistemas lipídicos são reportados na literatura para a estabilização via nanoencapsulamento de diferentes componentes. Para além disso, estes materiais são utilizados como aditivos na indústria alimentar.

Partindo da lecitina de soja, foram utilizados os métodos de injeção etanólica e hidratação lipídica, dado que habitualmente estão associados a elevadas eficiências de encapsulamento. Contudo, a aplicação à escala industrial deste processo apresenta limitações quer a nível financeiro quer a nível experimental. Considerando estes aspetos, foi também realizado o encapsulamento com maltodextrina (DE20), o qual se apresenta de mais fácil realização e economicamente favorável.

3.4.1 Lipossomas

Relativamente ao encapsulamento foram adoptados dois sistemas, os lipossomas e maltodextrinas.

O sistema lipossomal foi executado por dois métodos que quando comparados apresentam eficiências de encapsulamento bastante altas e não apresentam uma diferença substancial entre os dois procedimentos (**Tabela 6**).

Contudo, e apesar da otimização deste sistema, a aplicação industrial deste método de encapsulamento não seria vantajosa a nível financeiro. Todo o processamento do encapsulado, quer por injeção quer por hidratação, verifica-se trabalhoso e dispendioso.

Tabela 6. Eficiência de encapsulamento dos extratos.

Extratos	Eficiência de Encapsulamento (%)	
	Injeção Etanólica	Hidratação Lipídica
<i>Raphanus sativus</i> L.	99.98	99.59
<i>Roselle sabdariffa</i> L.	99.88	98.17
<i>Beta vulgaris</i> L.	98.33	99,35
<i>Opuntia stricta</i>	90,87	92,01

3.4.2 Maltodextrina (DE20)

A maltodextrina é produto de amidos hidrolisados com diferentes equivalentes de dextrose e é mencionada como uma matriz de encapsulamento utilizada na indústria alimentar.

Todos os extratos foram adicionados a maltodextrina e dissolvidos em água destilada, posteriormente centrifugados para encapsulamento do extrato pela matriz de polissacarídeo.

Foram encapsulados todos os extratos e todos eles obtiveram rendimentos próximos de 100%.

Do ponto de vista industrial, este método de encapsulamento demonstra-se ser simples e menos dispendioso comparativamente com o encapsulamento em lecitina de soja.

3.5 Atividade biológica

Atendendo à aplicação específica no fiambre pretendida neste trabalho, assim como a outras potenciais aplicações na área alimentar, foi avaliada a citotoxicidade dos extratos obtidos em células do

adenocarcinoma gástrico humano (AGS). Estes estudos foram efetuados através de uma colaboração existente no âmbito do projeto de investigação no qual se insere esta dissertação.

Os resultados obtidos para os extratos de *Raphanus sativus* L., *Roselle sabdariffa* L., *Beta vulgaris* L. e *Opuntia stricta*, mostram ausência de citotoxicidade em todos os casos. Acresce o facto de os pigmentos de antocianinas e betalainas presentes nestes extratos estarem associados a propriedades benéficas para a saúde do consumidor, capacidade antioxidante e anticancerígena, o que os torna interessantes ao nível da indústria alimentar.

3.6 Aplicação dos extratos no fiambre

Atendendo a que o objetivo principal desta dissertação era a avaliação da possibilidade de aplicação de corantes naturais, como alternativa ao carmim de cochonilha (E120) e outros corantes não permitidos pela legislação em produtos à base de carne processada, designadamente fiambre da perna, a fim de ser obtida uma cor rosada atrativa para o consumidor, foram usados extratos liofilizados na preparação do fiambre. Assim, os extratos de *Roselle subdariffa*, *Beta vulgaris* L. e *Opuntia stricta* não encapsulados e encapsulados em maltodexina após liofilização, e carmim de cochonilha (E120) comercial como padrão de comparação, foram adicionados à formulação e efetuadas as preparações correspondentes de fiambre da perna à escala piloto na empresa Primor.

Para esta avaliação dos resultados obtidos no fiambre com os extratos testados, foi utilizado o fiambre da perna produzido e comercializado actualmente pela Primor, e o fiambre preparado por adição do carmim de cochonilha (E120) com concentração de 0,1 g/kg. Estes dois fiambres representam, respetivamente a cor atualmente existente e que se pretende melhorar, e a cor óptima que se pretende obter com pigmentos naturais permitidos pela legislação. Na Tabela 8 são apresentados os resultados obtidos no fiambre, sem corante, pela aplicação do corante E120 e dos diferentes extratos liofilizados com os valores massa de extrato/kg de fiambre aplicados nos diferentes ensaios.

Tabela 7. Resultados visuais obtidos pela aplicação dos diversos extratos em diversas

Ensaio	Resultado visual
Fiambre sem corante	
Fiambre com E120 (0,4 g/kg)	
Fiambre com E120 (0,24 g/kg)	
Fiambre com E120 (0,1 g/kg)	
Fiambre com <i>Roselle sabdariffa</i> L. (3,6 g/kg)	

Fiambre com *Roselle sabdariffa* L. MD
(6,93 g/kg; 1 g de extrato/kg)



Fiambre com *Beta vulgaris* L.
(0,4 g/kg)



Fiambre com *Beta vulgaris* L.
(0,88 g/kg)



Fiambre com *Beta vulgaris* L.
(4,55 g/kg)



Fiambre com *Beta vulgaris* L. MD
(7,29 g/kg; 1 g de extrato/kg)



Fiambre com *Opuntia stricta*
(1,63 g/kg)



Fiambre com *Opuntia stricta* MD
(6,79 g/kg; 1 g de extrato/kg)



Fiambre com *Opuntia stricta* MD
(12,5 g/kg; 2 g de extrato/kg)



Fiambre com *Opuntia stricta* MD
(26,88 g/kg; 3,8 g de extrato/kg)



Relativamente ao *Raphanus sativus* L., apesar de apresentar boa coloração aquando a sua adição à salmoura, seria necessário uma maior quantidade de extrato para obter uma coloração de grande intensidade como observado nos restantes extratos.

Foram realizados ensaios com o *Roselle sabdariffa* L., visto ser aquele que dentro do grupo das antocianinas obteve uma maior concentração de pigmento (antocianinas) por kg de extrato. No ensaio realizado com o extrato seleccionado verificou-se que a cor pretendida estava longe de ser alcançado,

quer na aplicação do extrato direto ou encapsulado com maltodextrina. Observou-se que a coloração do fiambre era escura em ambos os casos, podendo sugerir que desde que é adicionado até ao final da cozedura as antocianinas sofrem uma perda de coloração.

Vários ensaios foram realizados com o extrato de *Beta vulgaris* L. com e sem maltodextrina (DE20), com diferentes concentrações e o mesmo sucedeu-se com o extrato de *Opuntia stricta*. Nestes extratos de betacianinas seria de esperar que apenas fosse aplicado o extrato de *Beta vulgaris* L. contudo, optamos por aplicar os dois extratos devido ao elevado poder colorimétrico inerente às betalainas e pela elevada estabilidade à temperatura referida na literatura (Figura 8).

No que diz respeito ao extrato de *Beta vulgaris* L., o extrato com 0,88 g/kg de fiambre demonstrou ser o resultado bastante aceitável em comparação com o fiambre sem adição de corante e o fiambre com coloração pretendida (com adição de E120). Este extrato apresenta a maior quantidade de pigmento por kg de extrato, e conseqüentemente não necessita de uma grande quantidade de extrato aplicado para obter alterações na cor final do fiambre.

Quanto ao extrato de *Opuntia stricta* apenas o extrato encapsulado com maltodextrina (DE20) demonstrou ser o resultado com melhor aspeto visual e na concentração de 2 g de extrato por kg de fiambre. No caso da *Opuntia stricta*, o encapsulamento demonstra estabilizar o seu pigmento durante a cozedura do fiambre e no final obter uma coloração com algum interesse.

3.7 Análise colorimétrica

Tabela 8. Dados colorimétricos sobre os diferentes extratos e dos diferentes fiambres onde foram aplicados os extratos em diferentes condições.

Amostra	L*	a*	b*	C*	h
Raphanus sativus L.	38,75	0,84	0,27	0,89	17,57
<i>Roselle sabdariffa</i> L.	37,35	2,40	0,43	2,43	10,20
<i>Beta vulgaris</i> L.	37,26	4,23	0,38	4,24	5,13
<i>Opuntia stricta</i>	32,20	2,62	-2,82	3,85	12,95
E120	36,29	0,52	4,26	4,29	82,89
Fiambre sem corante	60,74	-0,32	6,84	6,85	92,92
Fiambre com E120 (0,4 g/kg)	59,57	6,05	2,22	6,44	20,05
Fiambre com E120 (0,24 g/kg)	59,38	5,34	3,59	6,63	35,33
Fiambre com E120 (0,1 g/kg)	59,89	1,84	3,59	4,08	61,56
Fiambre com <i>Roselle sabdariffa</i> L. (3,6 g/kg)	63,22	-0,19	6,03	6,03	92,09
Fiambre com <i>Roselle sabdariffa</i> L. MD (6,93 g/kg; 3,66 g de extrato/kg)	59,09	2,19	4,79	5,27	66,83
Fiambre com <i>Beta vulgaris</i> L. (0,4 g/kg)	63,47	1,06	6,52	6,60	80,80
Fiambre com <i>Beta vulgaris</i> L. (0,88 g/kg)	60,91	3,68	5,66	7,01	58,26
Fiambre com <i>Beta vulgaris</i> L. (4,55 g/kg)	58,37	4,64	9,62	10,69	64,12
Fiambre com <i>Beta vulgaris</i> L. MD (7,29 g/kg; 1 g de extrato/kg)	61,54	0,36	8,71	8,73	87,84
Fiambre com <i>Opuntia stricta</i> (1,63 g/kg)	60,52	1,12	8,38	8,73	82,68
Fiambre com <i>Opuntia stricta</i> MD (6,79 g/Kg ; 1 g de extrato/kg)	61,49	-0,29	7,27	7,27	92,31
Fiambre com <i>Opuntia stricta</i> MD (12,5 g/kg; 2 g de extrato/kg)	60,56	3,97	8,89	9,72	64,42
Fiambre com <i>Opuntia stricta</i> MD (26,88 g/kg; 3,8 g de extrato/kg)	56,69	9,89	3,62	10,57	20,06

Os ensaios com extrato de *Roselle sabdariffa* L. foram realizados com o extrato encapsulado e não encapsulado, sendo que a concentração de pigmento em ambos os ensaios é muito próxima. Os ensaios demonstram valores de a^* diferentes sendo que o resultado mais próximo do expectável é dado pela aplicação do extrato desta espécie encapsulado. Relativamente aos valores de b^* , o extrato encapsulado apresenta o valor próximo do pretendido. Os valores de L^* são próximos em ambos os ensaios com extrato de *Roselle sabdariffa* L., e comparativamente com os valores alvo não existe diferença substancial. Na avaliação geral da cor pelo colorímetro, e associado ao aspeto visual final do fiambre onde o extrato é aplicado, o melhor resultado é dado pelo extrato encapsulado com maltodextrina. Apesar de este extrato não apresentar o maior valor de a^* , correspondente à cor vermelha, o valor de b^* , correspondente à contribuição de pigmentação amarela, é menor que o extrato não encapsulado e no global faz com que apresente melhor coloração no produto final.

Verifica-se o efeito protetor do encapsulamento com maltodextrina, visto que o extrato encapsulado obteve resultados mais próximos do pretendido.

Os ensaios com extrato de *Beta vulgaris* L. foram realizados com o extrato encapsulado e não encapsulado, com diferentes concentrações. Os ensaios demonstram valores de a^* diferentes sendo que o resultado mais próximo do ensaio com E120 (0,1 g/kg) é dado pela aplicação do extrato da *Beta vulgaris* L. com concentração de 4 g/kg. Relativamente aos valores de b^* , o extrato não encapsulado desta espécie com concentração de 0,88 g/kg apresenta um valor próximo do desejado. Os valores de L^* são próximos em ambos os ensaios com extrato encapsulado e não encapsulado e semelhantes ao pretendido.

Acompanhando os resultados do colorímetro e o aspeto final dos fiambres correspondentes ao ensaio dos extratos de *Beta vulgaris* L. verificamos que o melhor resultado advém da aplicação do extrato não encapsulado com a concentração de 0,88 g de extrato/kg de fiambre. Este extrato não apresentar o maior valor de a^* , no entanto o seu valor de b^* é o menor resultando numa menor contribuição de pigmentação amarela e o valor relativo à pigmentação vermelha não está longe do verificado no ensaio do E120. Na coloração do fiambre em questão verifica ter o melhor e mais aceitável resultado visual.

Os ensaios com extrato de *Opuntia stricta* foram realizados com o extrato encapsulado e não encapsulado. Os ensaios demonstram valores de a^* diferentes sendo que o resultado mais próximo do expectável é dado pela aplicação do extrato da *Opuntia stricta* encapsulada com concentração 2 g/kg. Relativamente aos valores de b^* , o extrato encapsulado com concentração 3,6 g/kg apresenta o valor pretendido. Os valores de L^* são próximos em ambos os ensaios com extrato de *Opuntia stricta*.

Associando os resultados obtidos com os resultados visuais da cor obtidos nos fiambres onde o extrato de *Opuntia stricta* é aplicado verificou-se que o melhor ensaio foi realizado com extrato de *Opuntia stricta* encapsulado com concentração de 2 g/kg.

É possível também observar o efeito do nanoencapsulamento do extrato com maltodextrina (DE20), que permite a obtenção de uma coloração mais interessante no fiambre em comparação com o extrato da mesma espécie não encapsulado.

4. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

O trabalho desenvolvido permitiu a seleção de quatro espécies vegetais, designadamente *Raphanus sativus* L., *Roselle sabdariffa* L., *Beta vulgaris* L. e *Opuntia stricta* e obtenção dos extratos correspondentes pela aplicação de condições experimentais, nas quais se variaram diferentes parâmetros, incluindo o sistema de solventes, com vista à obtenção das maiores quantidades possíveis de pigmentos tendo sempre presente a estabilidade dos mesmos. As percentagens mássicas (m/m) determinadas para os extratos liofilizados foram de 3,6% (*Raphanus sativus* L.), 35% (*Roselle sabdariffa* L.), 8,7% (*Beta vulgaris* L.) e 7,0% (*Opuntia stricta*).

Os extratos foram parcialmente caracterizados por técnicas analíticas (RMN, UV/Visível, HPLC-DAD e espetrometria de massa), bem como avaliados relativamente à estabilidade a diferentes parâmetros físico-químicos (pH, temperatura e luz). Com base nos dados de UV/Visível foi possível estimar as quantidades de pigmentos nos extratos obtidos, designadamente de antocianinas em *Raphanus sativus* L. e *Roselle sabdariffa* L., assim como de betaxantinas e betacianinas em *Beta vulgaris* L. e *Opuntia stricta*.

Estudos de nanoencapsulamento em sistemas lipídicos de lecitina de soja e maltodextrina foram efetuados e revelaram eficiências de encapsulamento elevadas em ambos os sistemas nos extratos liofilizados das quatro espécies usadas. Por questões práticas, incluindo económicas, relacionadas com a viabilidade de aplicação a nível industrial, decidiu-se selecionar a maltodextrina para os ensaios em fiambre.

Atendendo a que o objetivo principal desta dissertação era a avaliação da possibilidade de aplicação de corantes naturais, como alternativa ao carmim de cochonilha e outros corantes não permitidos pela legislação em produtos à base de carne processada, designadamente fiambre da perna, a fim de ser obtida uma cor rosada atrativa para o consumidor, foram usados extratos liofilizados para a preparação do fiambre. Assim, os extratos de *Raphanus sativus* L., *Roselle sabdariffa* L., *Beta vulgaris* L. e *Opuntia stricta* não encapsulados e encapsulados em maltodextrina após liofilização, e carmim de cochonilha (E120) comercial como padrão de comparação, foram adicionados à formulação e efetuadas as preparações correspondentes de fiambre da perna à escala piloto na empresa Primor. Amostras de fiambre desses ensaios foram submetidas a avaliação visual e análises colorimétricas usando o Sistema CIELab.

Considerando a cor obtida no fiambre contendo carmim de cochonilha 0,1 g/kg (massa de corante/kg de fiambre) como padrão para comparação, verificou-se que dos extratos aplicados o que se encontrava mais próximo do pretendido pertence à *Beta vulgaris* L. com a concentração 0,88 g/kg (massa de corante/kg de fiambre). Os resultados obtidos com extrato de *Roselle sabdariffa* L.,

apresentavam igualmente valores próximos do pretendido. Contudo, a quantidade de extrato necessária era superior à usada na *Beta vulgaris* L. (3,6 g/kg). No caso da *Opuntia stricta*, o melhor resultado foi obtido com o extrato encapsulado com maltodextrina (DE20) (12,5 g/kg). Destaca-se o facto de tanto a nível visual como colorimétrico ser possível verificar no fiambre a influência da presença dos pigmentos amarelos (betaxantinas) presentes nos extratos de *Beta vulgaris* L. e *Opuntia stricta*. O efeito do nanoencapsulamento com maltodextrina é notório no caso da *Opuntia stricta*, dado que a mesma concentração de extrato não encapsulado e extrato encapsulado originaram diferenças de coloração no fiambre, sendo a mais adequada obtida com o extrato encapsulado.

Globalmente, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a coloração do fiambre da perna obtida com extrato de *Beta vulgaris* L. liofilizado é muito promissora para futuras aplicações neste tipo de produtos cárneos.

Para além das análises visual e colorimétrica efectuadas neste trabalho, outros aspetos deveriam ser avaliados à semelhança do que é a prática corrente na indústria alimentar, tais como o tempo de armazenamento, contaminações do produto, análise biológica e até uma análise sensorial (degestação e textura) do produto. Essa avaliação será considerada e efetuada em futuros ensaios na empresa Primor.

Os resultados obtidos com os extratos estudados, designadamente de *Beta vulgaris* L. e *Opuntia stricta* nanoencapsulada são promissores, tal como já referido. No entanto, quando comparados com as amostras obtidas pela aplicação do carmim de cochonilha E120, corante não permitido pela legislação em fiambre, verifica-se que são ainda necessárias melhorias no processo de coloração de modo à obtenção da cor ótima para o produto. Essas melhorias poderão passar por alterações no sistema de extração dos pigmentos, processos de encapsulamento e até pela utilização de novas fontes de extração.

Para além disso, estes resultados abrem também a possibilidade de coloração com os extratos estudados de outros produtos alimentares não necessariamente cárneos e que necessitem de um melhoramento a nível visual para se tornarem mais atrativos ao consumidor. Além da cor, convém destacar as valências para a saúde humana anteriormente referidas destas espécies e dos seus extratos que podem ser uma simultaneamente valorizadas.

BIBLIOGRAFIA

1. Amchova, P.; Kotolova, H.; Ruda-Kucerova, J. Healthy safety issues of synthetic food colorants. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2015**, *73*, 1-9.
2. Portaria nº 759/2000 de 18 de Agosto. *Diário da República nº 193/2000 – I Série-A*. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação, da Saúde e do Ambiente e Recursos Naturais. Lisboa.
3. Sezgin, A.; Ayyildiz, S. *Food additives: colorants*. **2017**. <https://www.researchgate.net/publication/322404775>
4. Constant, P. B. L.; Stringheta, P. C.; Sandi, D. Corantes alimentícios. *B.CEPPA*. **2002**, *20*, 203-220.
5. Prado, M. A.; Godoy, H. T. Corantes artificiais em alimentos. *Alim. Nutr.* **2003**, *14*, 237-250.
6. Delgado-Vargas, F.; Jiménez, A. R.; Paredes-López, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Food Sci. Nutr.* **2010**, *40*, 173–289.
7. Schiozer, A. L.; Barata, L. E. S. Stability of natural pigments and dyes. *Revista Fitos*. **2007**, *2*, 6-24.
8. Wissgott, U.; Bortlik, K. Prospects for new natural food colorants. *J. Food Sci. Technol.* **1996**, *71*, 298-302.
9. Dapson, R.W. The history, chemistry and modes of action of carmine and related dyes. *Biotech. Histochem.* **2007**, *82*, 173-187.
10. Méndez-Gallegos, S. J.; Tarango-Arámbula, L. A.; Carnero, A.; Tiberi, R.; Díaz-Gómez, O. Growth parameters of cochineal *dactylopius coccus* costa reared in five cactus pear cultivars *Opuntia stricta ficus-indica* mill. *Agrociencia*. **2010**, *44*, 225-234.
11. Flores-Alatorre, H. L.; Abrego-Reyes, V.; Reyes-Esparza, Angeles, J. A.; Alba-Hurtado, E.F. Variation in the concentration of carminic acid produced by *dactylopius coccus* (hemiptera: dactylopiidae) at various maturation stages. *J. Eco. Entomol.* **2014**, *107*, 1700-1705.
12. González, E. A.; García, E. M.; Nazareno, M. A. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of cochineal (*dactylopius coccus* C.) extracts. *Food Chem.* **2010**, *119*, 358-362.
13. Fernández-López, J. A.; Angosto, J. M.; Giménez, P. J.; León, G. L. Thermal stability of selected natural red extracts used as food colorants. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2013**, *68*, 11–17.
14. Borges, M E.;Tejera, R. L.; Díaz, L.; Esparza, P.; Ibañez, E. Natural dyes extraction from cochineal (*dactylopius coccus*): new extraction methods. *Food Chem.* **2012**, *132*, 1855-1860.

15. Ruby, M. B. Vegetarianism: a blossoming field of study. *Appetite*. **2012**, *58*, 141-150.
16. Scientific opinion on the re-evaluation of cochineal, carminic acid, carmines (E 120) as a food additive. *EFSA Journal*. **2015**, *13*.
17. Giusti, M. M.; Wrolstad, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by uv-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. **2001**, *F1.2.1-F1.2.13*.
18. Stintzing, F. C.; Carle, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food and in human nutrition. *Food Sci. Technol*. **2004**, *15*, 19-38.
19. Wrolstad, R. E.; Durst, R. W.; Lee, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Food Sci. Technol*. **2005**, *16*, 423-428.
20. Kong, J.; Chia, L.; Goh, N.; Chia, T.; Brouillard, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochem*. **2003**, *64*, 923-933.
21. Lopes, T. J.; Xavier, M. F.; Quadri, M. G. N.; Quadri, M. B. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. *R. Bras. Agrociência*. **2007**, *13*, 291-297.
22. Wang, S. Y.; Lin, H. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem*. **2002**, *48*, 140-146.
23. Meiers, S.; Kemény, M.; Weyand, U.; Gastpar, R.; Von Angerer, E.; Marko, D. The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor. *J. Agric. Food Chem*. **2001**, *49*, 958-962.
24. Stintzing, F. C.; Stintzing, A. S.; Carle, R.; Frei, B.; Wrolstad, R. E. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *J. Agric. Food Chem*. **2002**, *50*, 6172-6181.
25. Chen, P.; Chu, S.; Chiou, H.; Kuo, W.; Chiang, C.; Hsieh, Y. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. *Cancer Letters*. **2006**, *235*, 248-259.
26. Feng, R.; Ni, H.; Wang, S. Y.; Tourkova, I. L.; Shurin, M. R.; Harada, H.; Yin, X. Cyanidin-3-rutinoside, a natural polyphenol antioxidant, selectively kills leukemic cells by induction of oxidative stress. *J. Bio. Chem*. **2007**, *282*, 13468-13476.
27. Brouillard, R.; Chassaing, S.; Isorez, G.; Kueny-Stotz, M.; Figueiredo, P. The visible flavonoids or anthocyanins: from research to applications. *Recent Advances in Polyphenol Research*. **2010**, *2*, 1-22.
28. Khoo, H. E.; Azlan, A.; Tang, S. T.; Lim, S. M. Anthocyanidins and anthocyanins: colored

- pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr. Res.* **2017**, *61*, 1-21.
29. Pan, F.; Liu, Y.; Liu, J.; Wang, E. Stability of blueberry anthocyanin, anthocyanidin and pyroanthocyanidin pigments and their inhibitory effects and mechanisms in human cervical cancer HeLa cells. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 10842 –10853.
30. Mazza, G.; Brouillard, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem.* **1987**, *25*, 207-225.
31. Andersen, Ø. M. Characterization of anthocyanins by NMR. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry.* **2003**, *F1.4.1-F1.4.23*.
32. McGhie, T. K.; Walton, M. C. The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 702–713.
33. Bueno, J. M.; Sáez-Plaza, P.; Ramos-Escudero, F.; Jiménez, A. M.; Fett, R.; Asuero, A. G. Analysis and antioxidant capacity of anthocyanin pigments. part ii: chemical structure, color, and intake of anthocyanins. *Critical Reviews in Analytical Chemistry.* **2012**, *42*, 126–151.
34. Andersen, O.M. Recent advances in the field of anthocyanins - main focus on structures. *Recent Advances in Polyphenol Research.* **2008**, *1*, 167–201.
35. Pereira, D. M.; Valentão, P.; Pereira, J. A.; Andrade, P. B. Phenolics: from chemistry to biology. *Molecules.* **2009**, *14*, 2202–2211.
36. Castañeda-Ovando, A; Pacheco-Hernández, M. L.; Páez-Hernández, M. E.; Rodríguez, J. A.; Galán-Vidal, C. A. Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chem.* **2009**, *113*, 859–871.
37. Giusti, M. M.; Rodríguez-Saona, L. E.; Wrolstad, R. E. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4631–4637.
38. Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290–4302.
39. Cabrita, L.; Fossen, T.; Andersen, O. M. Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chem.* **2000**, *68*, 101-107.
40. Horbowicz, M.; Kosson, R.; Grzesink, A.; Debski, H. Anthocyanin of fruits and vegetables—their occurrence, analysis and role in human nutrition. veg. crops res. *Bull.* **2008**, *68*, 5–22.

41. Cavalcanti, R. N.; Santos, D. T.; Meireles, M. A. A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems- an overview. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 409–509.
42. Malien-Aubert, C.; Dangles, O.; Amiot, M. J. Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition protective effects by intra and intermolecular copigmentation. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 170–176.
43. Patras, A.; Bruton, N. P.; O'Donnell, C.; Tiwari, B. K. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in food; mechanisms and kinetics of degradation. *Food Sci. Technol.* **2010**, *21*, 3-11.
44. Holzwarth, M.; Korhummel, S.; Carle, R.; Kammere, D. R. Impact of enzymatic mash maceration and storage on anthocyanin and color retention of pasteurized strawberry pureé. *Eur. Food Res. Technol.* **2012**, *234*, 207–222.
45. Crinó, M. A.; Heenan, C. N.; Nguyena, M. H.; Stathopouloa, C. E. The stability of natural red/pink food colours in ultrahigh-temperature (UHT) products. *J. Sci. Food Agric.* **2013**, *93*, 2022–2027.
46. Brouillard, R. The *in vivo* expression of anthocyanin colour in plants. *Phytochem.* **1983**, *22*, 131 I – 1323.
47. Rodriguez-Amaya, D. B. Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Sci.* **2016**, *7*, 20–26.
48. Dangles, O.; Fenger, J. The chemical reactivity of anthocyanins and its consequences in food science and nutrition. *Molecules.* **2018**, *23*, 1970-1993.
49. Nuryanti, S.; Matsjeh, S.; Anwar, C.; Raharjo, T. Isolation anthocyanin from roselle petals (*hibiscus sabdariffa* L.) and the effect of light on the stability. *Indo. J. Chem.* **2012**, *12*, 167 – 171.
50. Sipahli, S. Identification, characterization and application of a natural food colourant from *Hibiscus sabdariffa* (thesis). Urban University of Technology, Durban, South Africa **2016**
51. Hubbermann, E. M.; Heins, A.; Stockmann, H.; Schwarz, Karin. Influence of acids, salt, sugars and hydrocolloids on the colour stability of anthocyanin rich black currant and elderberry concentrates. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, *223*, 83–90.
52. Skrede, G.; Wrolstad, R.E.; Lea, P.; Enersen, G. Color Stability of Strawberry and Blackcurrant Syrups. *J. Food Sci.* **1992**, *57*, 172-177.

53. Coutinho, I.B.; Freitas, A.; Maçanita, A.L. Effect of water content on the acid–base equilibrium of cyanidin-3-glucoside. *Food Chem.* **2015**, *172*, 476–480.
54. García-Viguera, C.; Bridle, P.. Influence of structure on color stability of anthocyanins and flavylum salts with ascorbic acid. *Food Chem.* **1999**, *64*, 21-26.
55. Ahmadiani N. Anthocyanin based blue colorants (dissertation). Ohio State University. **2012**.
56. Matsufuji, H.; Kido, H.; Misawa, G.; Yaguchi, J.; Otsuki, T.; Chino, M.; Takeda, M.; Yamagata, K. Stability to light, heat, and hydrogen peroxide at different ph values and dpph radical scavenging activity of acylated anthocyanins from red radish extract. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 3692–3701.
57. Santos-Buelga, C.; Mateus, N.; Freitas, V. D. Anthocyanins: Plant pigments and beyond. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 6879-6884.
58. Krishnan, V.; Singh, S.; Kaur, C.; Dahuja, A. Anthocyanin: A functional superfood supplement. **2017**.
59. Strack, D.; Vogt, T.; Schliemann, W. Recent advances in betalain research. *Phytochem.* **2003**, *62*, 247–269.
60. Zrýd, J.; Christinet, L. Betalain pigments: Review. **2003**.
61. Herbach, K. M.; Stintzing, F. C.; Carle, R. Betalain Stability and Degradation— Structural and Chromatic Aspects. *J. Food Sci.* **2006**, *71*.
62. Quina, F. h.; Bastos; E. L. Chemistry Inspired by the Colors of Fruits, Flowers and Wine. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* **2018**, *90*, 681-695.
63. Esatbeyoglu, T.; Wagner, A. E.; Schini-Kerth, V. B.; Rimbach, G. Betanin—A food colorant with biological activity. *Mol. Nutr. Food Res.* **2015**, *59*, 36–47.
64. Stintzing, F.C.; Schieber, A.; Carle, R. Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *216*, 303-311.
65. Sapers, G. M.; Hornstein, J. S. Varietal differences in colorant properties and stability of red beet pigments, *J. Food Sci.* **1979**, *44*, 1245–1248.
66. Saguy, I; Goldman, M.; Bord, A.; Cohen, E. Effect of oxygen retained on beet powder on the stability of betanine and vulgaxanthine I. *J Food Sci.* **1984**, *49*, 99–101.
67. Herbach, K.M.; Stintzing, F.C.; Carle, R. Impact of Thermal Treatment on Color and Pigment Pattern of Red Beet (*Beta vulgaris* L.) Preparations. *J. Food Sci.* **2004a**, *69*, 491-498.

68. Azeredo, H. M.C. Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2009**, *44*, 2365–2376.
69. Castellar, R.; Obón, J. M.; Alacid, M.; Fernandez-Lopez, J. A. Color Properties and Stability of Betacyanins from *Opuntia stricta* Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2772–2776.
70. Sturzoiu, A.; Stroescu, M.; Stoica, A.; Dobre, T. Bextraction from beta vulgaris – experimental research and statistical modelling. *U.P.B. Sci. Bull.* **2011**, *73*, 145-156.
71. Udonkang, M. I.; Inyang, I. J.; Ukorebi, A. N.; Effiong, F.; Akpan, U.; Bassey, I. E. Spectrophotometry, Physiochemical Properties, and Histological Staining Potential of Aqueous and Ethanol Extracts of Beetroot on Various Tissues of an Albino Rat. *Biomed. Hub.* **2018**, *3*.
72. Herbach, K. M.; Stintzing, F. C.; Carle, R. Thermal degradation of betacyanins in juices from purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose) monitored by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric analyses. *Eur Food Res Technol.* **2004b**, *219*, 377–385.
73. MoBhammer, M.R.; Maier, C.; Stintzing, F.C.; Carle, R. Impact of Thermal Treatment and Storage on Color of Yellow-Orange Cactus Pear (*Opuntia stricta ficus-indica* [L.]Mill.cv.'Gialla') Juices; *J. Food Sci.* **2006**, *71*, 400-406.
74. Robert, P.; Torres, V.; García, P.; Vergara, C.; Sáenz, C. The encapsulation of purple cactus pear (*Opuntia stricta ficus-indica*) pulp by using polysaccharide-proteins as encapsulating agent. *LWT. Food Sci. Technol.* **2014**.
75. Kushwaha, R.; Kumar, V.; Vyas, G.; Kaur, J. Optimization of Different Variable for Eco-friendly Extraction of Betalains and Phytochemicals from Beetroot Pomace. *Waste Biomass Valor.* **2018**, *9*, 1485–1494.
76. Von Elbe, J.H.; Maing, I.Y.; Amundson, C.H. Colour stability of betanin. *J. Food Sci.* **1974**, *39*, 334–337.
77. Huang, A.S.; Von Elbe, J.H. Effect of pH on the degradation and regeneration of betanine. *J. Food Sci.* **1987**, *52*, 1689–93.
78. Herbach, K. M.; Stintzing, F. C.; Carle, R. Betalain Stability and Degradation— Structural and Chromatic Aspects. *J. Food Sci.* **2006**, *71*, 41-50.
79. Skopinska, A.; Tuwalska, D.; Wybraniec, S.; Starzak, K.; Mitka, K.; Kowalski, P.; Szaleniec, M. Spectrophotometric study on betanin photodegradation. *Nat. Sci.* **2007-2010**, 34-38.
80. Von Elbe, J.H.; Attoe, E.L. Oxygen involvement in betanine degradation - Measurement of active oxygen species and oxidation reductionpotentials. *Food Chem.* **1985**, *16*, 49 – 67.

81. Huang, A.S.; von Elbe, J.H. Effect of pH on the degradation and regeneration of betanine. *J. Food Sci.* **1987**, *52*, 1689–93.
82. Czapski, J. Heat stability of betacyanins in red beet juice and in betanin solutions. *Eur. Food Res. Technol.* **1990**, *191*, 275–278.
83. Sobkowska, E.; Czapski, J.; Kaczmarek, R. Red table beet pigment as food colorant. *Int. Food Ing.* **1991**, *3*, 24–28.
84. Pasch, J.H.; von Elbe, J.H. Betanine stability in buffered solutions containing organic acids, metal cations, antioxidants, or sequestrants. *J. Food Sci.* **1979**, *44*, 72–74.
85. Ravichandran, K.; Ravichandran, P.; Saw, N. M. T.; Gabr, A. M. M.; Ahmed, A. R.; Knorr, D.; Smetanska, I. Effects of different encapsulation agents and drying process on stability of betalains extract. *J. Food Sci Technol.* **2012**.
86. Neelwarne, B. Red Beet Biotechnology - Food and Pharmaceutical Applications. **2013**. (ISBN 978-1-4614-3457-3)
87. Kluge, R. A; Preczenhak, A. P.. Betalainas em *Beta vulgaris L.* minimamente processada: perdas e formas de preservação. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha.* **2016**, *17*, 175-192.
88. Cai, Y.; Sun, M.; Corke, H. Antioxidant Activity of Betalains from Plants of the Amaranthaceae. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2288–2294.
89. Stintzing, F. C.; Herbach, K. M.; Mosshammer, M. R.; Carle, R.; Yi, W.; Sellappan, S.; Akoh, C. C.; Bunch, R.; Felker, P. Color, Betalain Pattern, and Antioxidant Properties of Cactus Pear (*Opuntia stricta* spp.) Clones. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 442–451.
90. Hayakawa, K.; Agarie, S. Physiological Roles of Betacyanin in a Halophyte, Suaeda japonica Makino. *J. Plant Prod. Sci.* **2010**, *13*.
91. Hilou, A.; Millogo-Rasolodimby, J.; Nacoulma, O.G. Betacyanins are the most relevant antioxidant molecules of *Amaranthus spinosus* and *Boerhavia erecta*. *J. Med. Plant. Res.* **2013**, *7*, 645-652.
92. Taira, J.; Tsuchida, E.; Katoh, M. C.; Uehara, M.; Ogi, T. Antioxidant capacity of betacyanins as radical scavengers for peroxy radical and nitric oxide. *Food Chem.* **2015**, *166*, 531-536.
93. Carmo, C. S.; Nunes, A.N.; Serra, A.T.; Ferreira-Dias, S.; Nogueira, I.; Duarte, C.M.M. A way to prepare a liposoluble natural pink colorant. *Green Chem.* **2014**.

94. Giusti, M. M.; Wrolstad, R. E. Characterization of Red Radish Anthocyanins. *J. Food Sci.* **1996**, *61*, 322-326.
95. Giusti, M. M.; Ghanadan, H.; Wrolstad, R. E. Elucidation of the Structure and Conformation of Red Radish (*Raphanus sativus*) Anthocyanins Using One- and Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Techniques. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4858–4863.
96. Liu, Y.; Murakami, N.; Wang, L.; Zhang, S. Preparative High-Performance Liquid Chromatography for the Purification of Natural Acylated Anthocyanins from Red Radish (*Raphanus sativus* L.). *J. Chrom. Sci.* **2008**, *46*, 743-746.
97. Tamura, S.; Tsuji, K.; Yongzhen, P.; Ohnishi-Kameyama, M.; Murakami, N. Six New Acylated Anthocyanins from Red Radish (*Raphanus sativus*). *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58*, 1259-1262.
98. Wentian, C.; Eric, K.; Jingyang, Y.; Shuqin, X.; Biao, F.; Xiaoming, Z. Improving red radish anthocyanin yield and off flavour removal by acidified aqueous organic based medium. *RSC Advances.* **2016**, *100*.
99. Patil, G.; Madhusudhan, M.C.; Babu, R.; Raghavarao, K. S. M. S. Extraction, dealcoholization and concentration of anthocyanin from red radish. *Chem. Eng. Proc.* **2009**, *48*, 364-369.
100. Dash, R. N.; Habibuddin, M.; Baruah, D. B. Anthocyanins fraction of red radish (*Raphanus sativus* L) protects hepatic damage induced by carbon tetrachloride in albino rats. *J. Exp. Integr. Med.* **2013**, *3*, 43-50.
101. Gao, R.; HJing, P.; Ruan, S.; Zhang, Y.; Zhao, S.; Cai, Z.; Qian, B. Removal of off-flavour from radish (*Rhaphanus sativus* L.) anthocyanin-rich pigments using chitosan and its mechanism(s). *Food Chem.* **2014**, *146*, 423-428.
102. Jing, P.; Zhao, S.; Ruan, S.; Xie, Z.; Dong, Y.; Yu, L. Anthocyanin and glucosinolate occurrences in the roots of Chinese red radish (*Rhapanus sativus* L.), and their stability to heat and pH. *Food Chem.* **2012**, *133*, 1569-1576.
103. El-Saidy, S. M.; Ismail, I. A.; EL-Zoghbi, M. A study on Roselle extraction as a beverage or as a source for anthocyanins. *Zagazig J. Agric. Res.* **1992**, *19*, 831-839.
104. Tzu, L.; Lin, H.H.; Chen, C.C.; Lin, M.C.; Chou, M.C and Wang, C.J. Hibiscus Sabdariffa extract reduces serum cholesterol in men and women. *Nut. Res.* **2007**, *27*, 140-145.
105. Cissé, M.; Bohuon, P.; Sambe, F.; Kane, C.; Sakho, M.; Dornier, M. Aqueous extraction of anthocyanin from Hibiscus sabdariffa: Experimental kinetics and modeling. *J. Food Eng.* **2012**, *109*, 16-21.

106. Du, C. T.; Francis, F. J. Anthocyanins of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *J. Food Sci.* **1973**, *38*, 810-812.
107. Sato, K.; Goda, Y.; Yoshihira, K.; Noguchi, H. Structure and Contents of Main Coloring Constituents in the Calyces of *Hibiscus sabdariffa* and Commercial Roselle Color. *J. Food Hyg. Soc.* **1991**, *32*, 301-307.
108. Domínguez-López, A; Remondetto, G. E.; Navarro-Galindo, S. Thermal kinetic degradation of anthocyanins in a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. cv. 'Criollo') infusion. *J. Food Sci. Technol.* **2008**, *43*, 322–325.
109. Grajeda-Iglesias, C.; Figueroa-Espinoza, M. C.; Barouh, N.; Baréa, B.; Fernandes, A.; Freitas, V.; Salas, E. Isolation and Characterization of Anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* Flowers. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 1709–1718.
110. Duangmal, K.; Saicheua, B; Sueprasarn, S. Roselle anthocyanins as a natural food colorant and improvement of its color stability. Proceedings of the AIC Color and Paints, Interim Meeting of the International Color Association, **2004**, 155-158.
111. Selim, K. A., Khalil, K. E., Abdel-Bary, M. S. & Abdel-Azeim, N. A. Extraction, encapsulation and utilization of red pigments from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) as natural food colourants. *J. Food Sci. Technol.* **2008**, 7-20.
112. Asolkar, L. V.; Kakkar, K. K; Chakre, O. J. Second Supplements to Chopra, s Glossary of Indian Medicinal Plants with Active Principles Part 1 (A-K). Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, India. **1992**, *44*. ISBN: 8172360487.
113. Tsai, P.J.; McIntosh, J.; Pearce, P.; Camden, B and Jordan, R.B. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *J. Food Res Int.* **2002**, *35*, 351- 356.
114. Christian, K. R.; Nair, M. G; Jackson, J. C. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory activity of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*). *J. Food Comp. Anal.* **2006**, *19*, 778-783.
115. Prenesti, E.; Berto, S.; Daniele, P. G; Toso, S. Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Food Chem.* **2007**, *100*, 433-438.
116. Chumsri, P.; Sirichote, A.; Itharat, A. Studies on the optimum conditions for the extraction and concentration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extract. *J. Sci. Technol.* **2008**, *30*, 133-139.
117. Abou-Arab, A. A.; Abu-Salem, F. M.; Abou-Arab, E. A. Physico- chemical properties of natural pigments (anthocyanin) extracted from Roselle calyces (*Hibiscus subdariffa*). *J. Am. Sci.* **2011**, *7*, 445-456.

118. Okoko, T.; Ere, D. *Hibiscus sabdariffa* extra activities on cadmium-mediated alterations of human U937 cell viability and activation. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. **2012**, 33-36.
119. Mahmoud, Y. I. Effect of extract of *Hibiscus* on the ultrastructure of the testis in adult mice. *Acta Histochemica*. **2012**, 114, 342-348.
120. Hwang, J.; Kuo, H.; Lin, C.; Kao, E. Inhibitory effect of liposome-encapsulated anthocyanin on melanogenesis in human melanocytes. *Pharm. Biol.* **2013**, 51, 941-947.
121. Sabzghabae, A. M.; Ataei, E.; Kelishadi, R.; Ghannadi, A.; Soltani, R.; Badri, S.; Shirani, S. Effect of *Hibiscus sabdariffa* Calices on Dyslipidemia in Obese Adolescents: A Triplemasked Randomized Controlled Trial. *Mat. Soc. Med.* **2013**, 25, 76-79.
122. Pérez-Torres, I.; Muñoz, A. Z.; Beltrán-Rodríguez, U.; Díaz-Díaz, E.; Martínez-Memije, R.; Lans, V. G.. Modification of the liver fatty acids by *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus (Malvaceae) infusion, its possible effect on vascular reactivity in a metabolic syndrome model. *Clin. Exp. Hypertens.* **2014**, 36, 123-131.
123. Tavakolifar, F.; Givianrad, M. H.; Saber-Tehrani, M. Extraction of anthocyanins from *hibiscus sabdariffa* and assessment of its antioxidant properties in extra virgin olive oil. *Fres. Env. Bull.* **2016**, 25, 3709-3713.
124. Gradinaru, G.; Biliaderis, C.G.; Kallithraka, S.; Kefalas, P.; Garcia-Viguera, C. Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition. *Food Chem.* **2003**, 83, 423-436.
125. Georgiev, V. G.; Weber, J.; Kneschke, E.; Denev, P. N.; Bley, T.; Pavlov, A. I. Antioxidant Activity and Phenolic Content of Betalain Extracts from Intact Plants and Hairy Root Cultures of the Red Beetroot *Beta vulgaris* cv. Detroit Dark Red. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2010**, 65, 105-111.
126. Kujala, S.; Vienola, Maarit S.; Karel D. Loponen, Klika Jyrki M.; Pihlaja, Kalevi. Betalain and phenolic compositions of four beetroot (*Beta vulgaris*) cultivars. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, 214, 505-510.
127. Nemzer, B.; Pietrzkowski, Z.; Spórna, A.; Stalica, P.; Thresher, W.; Michalowski, T.; Wybraniec, S. Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (*Beta vulgaris* L.) dried extracts. *Food Chem.* **2011**, 127, 42-53.
128. Chhikara, N.; Kushwaha, K.; Sharmab, P.; Gata, Y.; Panghala, A. Bioactive compounds of beetroot and utilization in food processing industry: A critical review. *Food Chem.* **2019**, 272, 192-200.

129. Sousa, L. A.; Konrad, L. E. K. ; Veeck, A. P. L.; Piovezan, M. Extração e Purificação de Betalainas de *Beta Vulgaris* L. e Aplicação Cosmetológica (tese). Instituto Federal de Santa Catarina. **2016**.
130. Chyosho, B.; Freitas, P. A. M. Extração do corante da *Beta vulgaris* L. (*beta vulgaris*) para aplicação em cosméticos. *Blucher*. **2018**, *1*, 516-519.
131. Cuchinski, A. S.; Caetano, J.; Dragunski, D. C. Extração do corante da *Beta vulgaris* L. (*beta vulgaris*) para utilização como indicador ácido-base. *Ecl. Quím*. **2010**, *35*, 17 – 23.
132. Zabotti, C.; Genena, A. K. Avaliação do potencial antioxidante do extrato obtido a partir da *Beta vulgaris* L. vermelha (*Beta vulgaris* l.) por meio do uso da água como solvente de extracção. *Cascavel*. **2013**, *6*, 195 - 200.
133. Bucur, L.; Tarălungă, G.; Schroder, V.. The betalains content and antioxidant capacity of red beet (*beta vulgaris* l. *subsp. vulgaris*) root. *Farmacia*, **2016**, *64*, 198-201.
134. Silva, D. V. T.; Baião, D. S.; Silva, F. O.; Alves, G.; Perrone, D.; Aguila, E. M. D.; Paschoalin, V. M. F. Betanin, a Natural Food Additive: Stability, Bioavailability, Antioxidant and Preservative Ability Assessments. *Molecules*. **2019**, *24*, 458- 473.
135. Georgiev, V. G.; Weber, J.; Kneschke, E.; Denev, P. N.; Bley, T.; Pavlov, A. I. Antioxidant Activity and Phenolic Content of Betalain Extracts from Intact Plants and Hairy Root Cultures of the Red Beetroot *Beta vulgaris* cv. Detroit Dark Red. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2010**, *65*, 105–111.
136. Gandia-Herrero, F.; Garcia-Carmona, F. Biosynthesis of betalains: yellow and violet pigments. *Plant Sci*. **2013**, *18*, 334-343.
137. Nemzer, B.; Pietrzkowski, Z.; Spórna, A.; Stalica, P.; Thresher, W.; Michalowski, T.; Wybraniec, S. Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (*Beta vulgaris* L.) dried extracts. *Food Chem*. **2011**, *127*, 42-53.
138. Obón, J.M.; Castellar, M.R.; Alacid, M.; Fernández-Lopes, J.A. Production of a red-purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *J. Food Eng*. **2009**, *90*, 471-479.
139. Castellar, M. R.; Solano, F.; Obón, J. M. Betacyanin and Other Antioxidants Production During Growth of *Opuntia stricta* (Haw.) Fruits. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2012**, *67*, 337–343.
140. Avila-Navaa, A.; Calderón-Olivera, M.; Medina-Camposa, O. N.; Zouc, T.; Guc, L.; Torres, N.; Tovar, A. R.; Pedraza-Chaverri, J. Extract of cactus (*Opuntia stricta ficus indica*) cladodes

- scavenges reactive oxygen species in vitro and enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J. Func. Foods.* **2014**, *10*, 13–24.
141. Merin, U.; Gagel, S.; Popel, G.; Bernstein, S.; Rosenthal, I. Thermal Degradation Kinetics of Prickly-Pear-Fruit Red Pigment. *J. Food Sci.* **1987**, *52*, 485-486.
142. Fernández-López, J. A.; Castellar, R.; Obón, J. M.; Almela, Luis. Monitoring by Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry the Impact of pH and Temperature on the Pigment Pattern of Cactus Pear Fruit Extracts. *J. Chrom. Sci.* **2007**, *45*, 120-125.
143. Sepúlveda, E.; Sáenz, C.; Aliaga, E.; Aceituno, C. Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia stricta* spp. *J. Arid Env.* **2007**, *68*, 534-545.
144. Braver, H. Technology for cooked ham production. Deutscher Fachverlag, **2009**.
145. Rodrigues, A. D. V. Monitorização do processo produtivo de Charcutaria. Braga: Universidade do Minho – Faculdade de Ciências, **2013**.
146. Ganhão, F. M. C. Evolução do teor de nitritos e de nitratos e da concentração de pigmentos no fiambre e na mortadela ao longo do seu processo produtivo e do seu prazo de vida útil. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa - Faculdade de Ciências e Tecnologias, **2010**.
147. Freixanet, L. Aditivos e ingredientes en la fabricación de productos cárnicos cocidos de músculo entero. Metalquimia.
148. Feiner, G. Color in Cured Meat Products and Fresh Meat. Salami: Practical Science and Processing Technology. **2016**, 89-101.
149. Kerry, J.F. Effects of novel thermal processing technologies on the sensory quality of meat and meat products. **2011**.
150. O’Sullivan, M.G. The Stability and Shelf Life of Meat and Poultry. *Els.* **2016**, 521-543.
151. Sebranek, J. G.; Bacus, J. N. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues?. *Meat Sci.* **2007**, *77*, 136-147.
152. Mancini, M. A. Improving the sensory and nutritional quality of fresh meat: *Meat Color.* **2009**, 89-110.
153. Andrés-Bello, A.; V. Barreto-Palacios, V.; García-Segovia, P.; Mir-Bel, J.; Martínez-Monzo, J. Effect of pH on Color and Texture of Food Products. *Food Eng Rev.* **2013**, *5*, 158–170.
154. Su, Y.L.; Fu, Z.Y.; Zhang, J.Y.; Wang, W.M.; Wang, H.; Wang, Y.C.; Zhang, Q.J. Microencapsulation of Radix salvia milthiorrizza nanoparticles by spray-drying. *Powder Tech.* **2008**, *118*, 114-121. Silva, H. R. P.;

155. Silva, C.; Bolanho, B. C. Ultrasonic-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris* L.). *J.Food Process Eng.* **2018**, *41*, 1-6.
156. Amjadia, S.; Ghorbanic, M.; Hamishehkard, H.; Roufegarinejada, L. Improvement in the stability of betanin by liposomal nanocarriers: Its application in gummy candy as a food model. *Food Chem.* **2018**, *256*, 156-162.
157. Rodrigues, A. R. O.; Matos, J. O. G.; Dias, A. M. N.; Almeida, B. G.; Pires, A.; Pereira, A. M.; Araújo, J. P.; Queiroz, M. J. R. P.; Castanheira, E. M. S. Coutinho, P. J. G. Development of Multifunctional Liposomes Containing Magnetic/Plasmonic MnFe₂O₄/Au Core/Shell Nanoparticles. *Pharmaceutics.* **2018**, *11*, 1-19.
158. Silva, T. C.; de Andrade, P. B.; Paiva-Martins, F.; Valentão, P.; Pereira, D. M. In Vitro Anti-Inflammatory and Cytotoxic Effects of Aqueous Extracts from the Edible Sea Anemones *Anemonia Sulcata* and *Actinia Equina*. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (3).
159. Pereira, R. B.; Taveira, M.; Valentão, P.; Sousa, C.; Andrade, P. B. Fatty Acids from Edible Sea Hares: Anti-Inflammatory Capacity in LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells Involves INOS Modulation. *RSC Adv.* **2015**, *5* (12), 8981–8987.