



Propriedades corantes e bioativas de sumo de sabugueiro: aplicação alimentar e estabilidade cromática

Ricardo Fernando Ribeiro da Silva

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

Orientadores:

João Carlos Martins Barreira

Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira

Sandrina Alves Heleno

Esta dissertação inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri

Bragança

Outubro 2017

Agradecimentos

Agradeço à minha mãe Celeste Ribeiro por apoiar-me nos bons e maus momentos, por sempre acreditar em mim e transmitir-me um sentimento de positivismo, porque sem a sua força e amor incansável não teria sido possível chegar até aqui. Ao meu pai Fernando Silva pelo apoio e incentivo que me passou apesar da distância e por toda a coragem que sempre me transmitiu. A eles devo toda a minha vida. Agradeço-vos profundamente.

À minha namorada Andreia Sousa, por me ter acompanhado ao longo de todos estes anos, pelo incentivo, carinho e intelecto que demonstrou; Por todas as experiências, lições de vida e por me tornar uma pessoa melhor, estou-te eternamente agradecido.

Aos meus orientadores, Doutor João Barreira por toda a sabedoria, genialidade e inspiração que me transmitiu e Doutora Sandrina Heleno por me ceder todo o seu conhecimento e aspiração. Pela excecional orientação e por toda a boa disposição, foi um gosto dividir esta etapa com vocês, muito obrigado.

À professora Doutora Isabel Ferreira por me conceder uma oportunidade de entrar na área de investigação, por ser uma inspiração neste ramo e por me permitir adquirir experiencia a nível profissional e pessoal.

À Doutora Lillian Barros por toda a instrução e disponibilidade que sempre ofereceu, é de facto um exemplo de sucedimento.

A todo o pessoal do Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada (LQBA) – BioChemcore por toda a disponibilidade que sempre demonstraram e pelo bom ambiente no espaço de trabalho. Agradeço em especial ao Custódio Roriz, à Ângela Fernandes e à Inês Dias pelo auxílio sempre prestado com prontidão e dedicação.

Aos meus amigos e familiares que acabaram por contribuir na conclusão deste trabalho.

Obrigado!

Resumo

O sabugueiro (*Sambucus nigra* L.) é uma planta largamente disseminada no território português, cuja floração ocorre no início do verão, sendo o fruto (bagas pretas brilhantes na maturação completa) formado no início do outono. As bagas de sabugueiro contêm grandes quantidades de compostos fenólicos, uma classe de compostos naturais que vem sendo progressivamente associada à prevenção e tratamento de doenças ou complicações de saúde, maioritariamente pela sua capacidade antioxidante. Para além desta bioatividade, os compostos fenólicos mais abundantes em bagas de sabugueiro, as antocianinas, têm também um elevado poder corante. Estes pigmentos naturais pertencem à classe dos flavonoides, sendo responsáveis por uma variedade de cores atrativas em flores e frutos, para além de estarem associadas a diferentes efeitos benéficos para a saúde. O seu potencial corante permite também promover a substituição de corantes sintéticos por naturais, o que terá a vantagem adicional de aumentar a segurança alimentar para o consumidor, considerando a potencial toxicidade da maioria dos compostos artificiais.

Tendo em conta a sua facilidade de obtenção, para além do seu baixo custo (associado apenas à mão de obra necessária à sua recolha), as bagas de sabugueiro representam uma fonte de compostos bioativos com elevado potencial de incorporação em alimentos. Esta abordagem traz benefícios importantes para a saúde do consumidor, além de representar uma estratégia eficaz para satisfazer as atuais exigências de mercado. Nesta perspetiva, os alimentos que recolhem grande preferência por parte do consumidor, mas que não representam exemplos típicos de alimentos saudáveis, são os que mais necessitam de melhorias nutricionais. Tal é o caso dos produtos de confeitaria, que apesar de não contribuírem significativamente para uma dieta equilibrada, são globalmente apreciados pelos consumidores.

Assim, os objetivos principais deste projeto são avaliar as propriedades corantes e bioativas de sumo de bagas de sabugueiro, e a posterior inclusão do seu sumo em produtos de confeitaria (especificamente croissants). Para além da melhoria nutricional e do aspeto inovador, os produtos desenvolvidos mantiveram as concentrações de antocianinas do sumo fresco, apresentado potenciais benefícios fisiológicos sobre a saúde dos consumidores.

Palavras-chave: Sabugueiro, antocianinas, bioatividade, corante natural, croissant.

Abstract

Elderberry is a widely disseminated plant in the Portuguese territory. The flowering takes place in early summer, while fruits (bright black berries at full maturation) are formed in early autumn. These berries contain high quantities of phenols, a class of natural compounds that is being progressively associated with the prevention and treatment of diseases or health problems, mainly due to their antioxidant capacity. Besides their bioactivity, the main phenolic compounds in elderberry (anthocyanins), have also a high dyeing power. These natural pigments belong to the class of flavonoids, being responsible for a variety of attractive colors in flowers and fruits. Their inclusion in diet, might have beneficial effects on the consumers' health. Regarding functional properties in foods, anthocyanins might be used as natural coloring agents, allowing to reduce/eliminate the addition of artificial dyes, thereby preventing the harmful effects associated to some classes of these compounds. This approach might have a positive effect on consumers' health, besides constituting an effective strategy to fulfil current market demands, especially when applied to highly consumed products.

Elderberries are easy to obtain and are nearly costless (if used in large scale, it would be necessary to cover expenses associated with the picking process), containing valuable bioactive compounds, with high potential to be included in specific food products. Among the last, some of the products more highly appreciated by consumers are usually far from representing the best examples of healthy foods, thereby being the ones with greatest need of improvement. Bakery products are a striking example of such foods, as, despite the dietary limitations, are globally enjoyed by consumers.

Therefore, this work was specifically designed to evaluate the bioactive and dyeing properties of elderberry berries, and to further incorporate their juice in bakery products, specifically in a new croissant formulation. Besides some nutritional improvement and the innovative appearance, the developed products maintained similar anthocyanin concentrations to those found in fresh juice, which indicates that the consumption of the developed products might convey physiologic benefits, promoting consumers health.

Keywords: Elderberry, anthocyanins, bioactivity, natural dyes, croissant.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Índice de figuras.....	vi
Índice de tabelas.....	vii
Lista de abreviaturas	ix
1. Introdução.....	1
1.1. Enquadramento	1
1.2. Antioxidantes e <i>stress</i> oxidativo	2
1.2.1. Atividade antioxidante	2
1.3. Aditivos alimentares.....	3
1.3.1. Antioxidantes como aditivos alimentares	4
1.3.2. Aditivos alimentares de origem natural	5
1.3.3. Compostos fenólicos.....	5
1.4. Antocianinas	6
1.4.1. Corantes naturais.....	9
1.5. Sabugueiro (<i>Sambucus nigra</i> L.).....	10
1.5.1. Compostos bioativos em bagas de sabugueiro	13
1.6. Alimentos funcionais	14
1.6.1. Limitações	14
1.7. Incorporação de antocianinas em produtos de confeitaria	15
1.7.1. Croissants.....	15
1.8. Objetivos.....	16
2. Material e Métodos.....	17
2.1. Padrões e reagentes	17
2.2. Amostras	17
2.3. Avaliação da atividade antioxidante.....	18
2.3.1. Preparação das amostras	18
2.3.2. Atividade captadora de radicais DPPH.....	18
2.3.3. Poder redutor.....	19
2.3.4. Inibição da descoloração do β-caroteno.....	19
2.4. Avaliação da atividade inibitória do crescimento de linhas celulares tumorais humanas	20
2.5. Análise das antocianinas	22

2.6. Preparação dos croissants	24
2.7. Caracterização química dos croissants	25
2.7.1. Teor de humidade	25
2.7.2. Teor de cinzas	26
2.7.6. Determinação da cor	29
2.8. Análise estatística	31
3. Resultados e Discussão	32
3.1. Bioatividade do sumo de sabugueiro (<i>Sambucus nigra</i> L.)	32
3.2. Caracterização das novas formulações de croissant	34
3.2.1. Composição nutricional	36
3.2.2. Açúcares livres	37
3.2.3. Ácidos gordos	38
3.2.4. Parâmetros de cor	40
3.2.5. Bioatividade dos croissants preparados	41
3.2.6. Estabilidade dos agentes corantes	42
4. Conclusões gerais	44
5. Referências bibliográficas	46

Índice de figuras

Figura 1 - Estrutura do DPPH*	2
Figura 2 - Estrutura geral das antocianinas.....	6
Figura 3 - Pormenor do fruto de sabugueiro.	10
Figura 4 - Estrutura química da sambunigrina.	11
Figura 5 - Estruturas químicas da cianidina-3-O-sambubiósido (A) e da cianidina-3-O-glucósido (B)..	13
Figura 6 - Leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc) onde foi lida a absorvância.....	19
Figura 7 - Espectrofotómetro AnalytikJena 200-2004 utilizado na leitura de absorvâncias	20
Figura 8 – Equipamento HPLC acoplado a um detetor de DAD e ESI-MS	22
Figura 9 - Exemplo de croissant preparado com 2% de sumo de sabugueiro. Da esquerda para a direita: após a primeira fermentação, após a segunda fermentação, após cozedura.....	24
Figura 10 – Amostras dos diferentes croissants para posterior análise. CB: Croissant base, sem qualquer agente corante. CS2: Croissants com 2% de sumo de sabugueiro; CS4: Croissants com 4% de sumo de sabugueiro; CS8: Croissants com 8% de sumo de sabugueiro; CCC: Croissants com 4% de corante comercial de cenoura preta.....	25
Figura 11 - Mufla (Lenton Thermal designs limited; ECF12/22) utilizada para a incineração das amostras.....	26
Figura 12 - Mecanismo de Soxhlet utilizado para a extração de gorduras	27
Figura 13 - Digestor (Foss™ Digestor) e tubos de ensaio com amostra digerida	28
Figura 14 - Equipamento Kjeldahl onde foram analisadas as proteínas.....	28
Figura 15 - colorímetro (modelo CR-400, Konica Minolta Sensing Inc., Tóquio, Japão) utilizado para a determinação da cor dos croissants.....	29
Figura 16 - Cromatógrafo gasoso DANI (modelo GC 1000) onde se levou a cabo a determinação de ácidos gordos.....	30
Figura 17 – Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência com um detetor de índice de refração (HPLC-RI) utilizado para determinar a composição de açúcares.....	31
Figura 18 – Perfil cromatográfico de antocianinas da amostra de sumo de sabugueiro gravado a 520 nm.....	33
Figura 19 - Esquema representativo de diferentes etapas da confeção dos croissants. A: Massa dos croissants antes de qualquer fermentação; B: Croissants modelados antes da segunda fermentação; C: Resultado final dos croissants.	35
Figura 20 - Aspeto dourado do croissant conferido pela reação de Maillard.....	42

Índice de tabelas

Tabela 1 - Estrutura básica das principais antocianinas.	8
Tabela 2 - Dados cromatográficos da identificação e quantificação de antocianinas.....	33
Tabela 3 - Composição nutricional (g/100 g) e valor energético (kcal/100 g) das diferentes formulações de croissants.....	36
Tabela 4 - Açúcares livres (g/100 g) das diferentes formulações de croissants.	37
Tabela 5 - Ácidos gordos maioritários (>1%) das diferentes formulações de croissants.	39
Tabela 6 - Parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) medidos no exterior e no recheio das diferentes formulações de croissants.....	41

Lista de abreviaturas

AGS: Ácidos gordos saturados	HepG2: Linha celular de carcinoma hepatocelular
AGMI: Ácidos gordos insaturados	HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência
AGPI: Ácidos gordos polinsaturados	HPLC-RI: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração
BHA: Hidroxianisole butilado (E320)	MCF-7: Linha celular de adenocarcinoma da mama
BHT: Hidroxitolueno butilado (E321)	MS: Espetrometria de massa
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium	NCI-H460: Linha celular de cancro do pulmão de células não-pequenas
DMSO: Dimetilsulfóxido	PG: Propilenoglicol
DPPH: 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazilo	RNS: Espécies reativas de azoto
EC₅₀: Concentração de extrato correspondente 50 % de inibição	ROS: Espécies reativas de oxigénio
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético	rpm: Rotações por minuto
EFSA: Autoridade Europeia de Segurança Alimentar	RPMI: Roswell Park Memorial Institute
FAME: Ésteres metílicos de ácidos gordos	SRB: Sulforrodamina B
GC/FID: Cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização em chama	t-BHQ: <i>Terc</i> -butil hidroquinona (E319)
HBSS: Solução salina equilibrada de Hank	TCA: Ácido tricloroacético
HeLa: Linha celular de carcinoma cervical	UV: Ultravioleta

1. Introdução

1.1. Enquadramento

Os antioxidantes representam nos dias de hoje uma ferramenta muito importante associada à prevenção de doenças (Apak et al. 2013). Todos nós necessitamos de antioxidantes, desde as crianças, nas quais os danos causados por radicais livres são mais perniciosos do que na fase adulta, até aos idosos, que são muito suscetíveis de sofrer de danos oxidativos.

Devido à sua segurança e potenciais efeitos nutricionais e terapêuticos, os antioxidantes e corantes naturais suscitam interesse científico, não só pelos benefícios que proporcionam ao organismo, como também por constituírem uma possível alternativa aos corantes sintéticos que estão associados a diversas complicações de saúde e são foco de preocupação por parte dos consumidores (Martins, Barros, and Ferreira 2016). Neste contexto, impõe-se a implementação de estratégias de produção que utilizem componentes naturais, preferencialmente com a dupla função de prevenir oxidações e atuar como corante. Os antioxidantes presentes na dieta alimentar poderão também atuar de forma complementar aos sistemas antioxidantes desenvolvidos pelo organismo de forma a exercer um efeito sinérgico, e assim prevenir o *stress* oxidativo mais naturalmente (Carocho and Ferreira 2013; Pisoschi and Pop 2015).

A exigência dos consumidores e a sua preocupação crescente em conseguir uma dieta equilibrada faz com que os alimentos funcionais sejam cada vez mais solicitados (Bruschi, Teuber, and Dolgoplova 2015; Quílez et al. 2006). O potencial corante e bioativo proporcionado pelo sumo de sabugueiro é indubitavelmente uma mais-valia para considerar esta matriz natural como uma fonte de compostos a incorporar em alimentos.

1.2. Antioxidantes e *stress* oxidativo

Os radicais livres são constantemente produzidos durante o funcionamento normal da célula, na maior parte das vezes sob a forma de espécies reativas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS), que após serem produzidos, são maioritariamente removidos pelas defesas antioxidantes da célula.

Contudo, uma produção excessiva de espécies reativas pode destruir o equilíbrio entre as defesas antioxidantes e as espécies reativas, sendo esse desequilíbrio designado como *stress* oxidativo (Pisoschi and Pop 2015; Carocho and Ferreira 2013; Valko et al. 2007; Ferreira and Abreu 2007; Lichtenberg and Pinchuk 2015). Esta condição, ao modificar o equilíbrio celular, torna-se mediadora de lesões celulares, e presume-se que desempenha um papel basal no desenvolvimento de muitas doenças, tais como aterosclerose, lesão de reperfusão, cataratogénese, artrite reumatoide, distúrbios inflamatórios, cancro e processos associados ao envelhecimento. Assim, a presença de antioxidantes naturais pode ser altamente benéfica para a proteção do corpo humano contra radicais livres, prevenindo o *stress* oxidativo e doenças associadas (Barros et al. 2011).

1.2.1. Atividade antioxidante

A necessidade de existência de ensaios modelo para avaliar a atividade antioxidante é crucial, de modo a que os resultados possam ser comparados com diferentes laboratórios e assim validar as conclusões. Alguns destes ensaios serão utilizados neste projeto.

O ensaio da atividade captadora de radicais livres, fundamenta-se no princípio de que um doador de hidrogénio é um antioxidante. Este ensaio colorimétrico usa o radical 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazilo (DPPH) (**Figura 1**), que muda de tom violeta para amarelo na presença de antioxidantes (Carocho and Ferreira 2013).

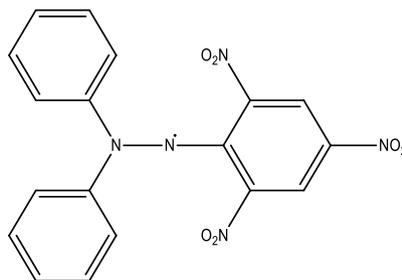
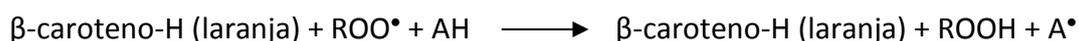


Figura 1 - Estrutura do DPPH*.

O ensaio do poder redutor é caracterizado pela redução do composto Fe^{3+} /ferricianeto à forma ferrosa (Fe^{2+}), que provoca uma alteração de cor desde amarelo a azul, e que é avaliado através de espectrofotometria a 690 nm (Carocho and Ferreira 2013).



A inibição da descoloração do β -caroteno, que pode ser medida pela neutralização do radical livre linoleato, baseia-se numa emulsão aquosa de ácido linoleico e β -caroteno, que é descolorada pelos radicais gerados pela oxidação espontânea de ácidos gordos graças a um processo incubação e agitação a 50 °C, e pela medição da absorvância a 470 nm antes e depois da indução térmica (Prieto et al. 2012).



1.3. Aditivos alimentares

O conceito de aditivo alimentar pode ser definido sendo qualquer substância cujo uso represente, direta ou indiretamente, uma melhoria das características de qualquer alimento, ou a sua manutenção ao longo do tempo, sem representar qualquer perigo para a saúde do consumidor, podendo ser utilizado na produção, transformação, tratamento, embalagem, transporte ou armazenamento de alimentos (Codex Alimentarius 1995; Food and Drug Administration of the United States of America 2010).

Os aditivos alimentares podem ser divididos em função da sua atividade como: conservantes, aditivos nutricionais, corantes, agentes aromatizantes, agentes texturizantes e agentes diversos. Os conservantes subdividem-se em antimicrobianos, antioxidantes e agentes anti escurecimento, enquanto os corantes abrangem os compostos contendo azoto, os derivados de quinoftalona, os compostos de triarilmetano, os xantenos e os pigmentos policíclicos (Carocho, Morales, & Ferreira, 2015; Márcio Carocho, Barreiro, Morales, & Ferreira, 2014).

1.3.1. Antioxidantes como aditivos alimentares

Os antioxidantes utilizam-se em alimentos com diferentes objetivos, incluindo a prevenção de fenómenos de rancificação (provocando odor e sabor desagradáveis), como resultado da oxidação de gorduras e óleos, ou a manutenção da integridade dos alimentos principalmente frutas, sumos e vegetais, impedindo reações de escurecimento ou a destruição de componentes essenciais (Carocho & Ferreira, 2013; Msagati, 2012).

A maioria dos antioxidantes artificiais contém uma funcionalidade fenólica com diferentes substituintes, tais como hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisole butilado (BHA), *tert*-butil hidroquinona (t-BHQ), propilenoglicol (PG), gossipol ou tocoferóis. O BHA é um antioxidante fenólico lipossolúvel, principalmente usado para a oxidação de lípidos em gordura animal, o BHT também é um antioxidante fenólico com as mesmas características de solubilidade, mas é mais estável a altas temperaturas. Geralmente estes dois antioxidantes são utilizados em conjunto, pois o BHA interage com radicais peróxido para produzir um radical fenóxido que por sua vez pode remover um átomo de hidrogénio do grupo hidroxilo do BHT. É regenerado de novo BHA graças ao hidrogénio que lhe é fornecido pelo BHT, e assim, visto que se formaram radicais em BHT, estes podem atuar como terminador de cadeia. A TBHQ é um antioxidante difenólico altamente eficaz em alimentos; não causa descoloração nem altera o sabor ou o odor do material ao qual é adicionado. O propilenoglicol é um éster formado pela condensação de ácido gálico e propanol (Brar, Dhillon, and Soccol 2014). A principal característica química que os torna adequados como antioxidantes é a baixa energia que requerem para libertação de hidrogénio, um elemento essencial para a interrupção ou diminuição da velocidade de reações de oxidação em sistemas alimentares (Msagati 2012).

Apesar de os antioxidantes conferirem benefícios para a saúde, a sua segurança tem sempre de ser validada cientificamente antes de serem incorporados em produtos alimentares (Msagati 2012). Muitas vezes, esta validação requer revisões periódicas, muito em virtude da associação de efeitos adversos aos antioxidantes artificiais.

É neste contexto, que tem vindo a procurar-se a utilização de diferentes antioxidantes de origem natural, como por exemplo de frutos, legumes, cereais ou algas (Gülçin 2012).

1.3.2. Aditivos alimentares de origem natural

Estes compostos têm vindo a ganhar interesse em relação aos aditivos artificiais, assumindo particular importância a nível da conservação de alimentos (Carocho et al., 2015), mas também como forma de conferir diferentes cores, sabores, odores, ou texturas, para satisfazer as expectativas dos consumidores (Carocho et al., 2014; Martins, Roriz, Morales, Barros, & Ferreira, 2016). A preferência por aditivos de origem natural está também relacionada com a emergência de notícias que relacionam diferentes problemas de saúde com aditivos de origem artificial, apesar do cuidado das autoridades competentes no campo da segurança alimentar (Carocho et al., 2015). No entanto, ainda não há definição de conservantes naturais, antioxidantes, corantes ou adoçantes. Apenas os aromatizantes naturais têm legislação tanto na UE como nos EUA, que é então transposta para as outras classes de aditivos, podendo levar a interpretações erradas e a confusão do que é natural ou sintético. Também não existem categorias definidas para aditivos alimentares naturais, no entanto os mais estudados são antioxidantes, antimicrobianos, corantes e aromatizantes (Carocho et al., 2015).

Alguns exemplos de antioxidantes naturais são os compostos fenólicos, ácido ascórbico, carotenoides e tocoferóis (Carocho et al., 2015).

1.3.3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos constituem um grupo extremamente diversificado, tanto a nível de estrutura química, como de função biológica. Todas as estruturas que possuem pelo menos um núcleo benzénico com um ou mais hidroxilos, livres ou envolvidos em ligações éster (tipicamente com açúcares) ou éter, são considerados compostos fenólicos. No entanto, existem diferentes compostos com um ou mais anéis benzénicos que são incluídos em grupos fitoquímicos distintos, muitas vezes com diferente origem biossintética como é o caso dos que derivam de aminoácidos que possuem um anel aromático e um átomo de azoto, que são considerados alcalóides, ou como muitos terpenos com um hidroxilo fenólico. Estes compostos derivam principalmente da via do chiquimato ou da via do acetato (Cunha 2014).

Esta grande classe de compostos pode ser subdividida em ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanos e taninos hidrolisáveis e condensados ou proantocianidinas (Vizzotto, Krolow, and Bruch 2010; Williamson and Clifford 2010).

O grupo dos flavonoides é formado a partir dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina e também unidades de acetato. A fenilalanina e a tirosina originam o ácido cinâmico e o ácido *p*-hidroxicinâmico, que, ao condensar-se com unidades de acetato originam a estrutura cinamoil dos flavonoides. O ácido cinâmico forma-se da fenilalanina por desaminação catalisada pela enzima fenilalanina amónia liase. Três unidades de malonil-CoA ligam-se aos ésteres do coenzima-A do ácido cinâmico dando lugar a anéis aromáticos resultando inicialmente em chalconas ou estilbenos. As chalconas vão depois funcionar como precursores de um vasto número de flavonoides, dos quais a maioria terá um anel heterocíclico com seis elementos, produzindo as flavanonas que, por sua vez, dão origem a flavonas, flavonóis, catequinas e antocianidinas (Cunha 2014).

1.4. Antocianinas

As antocianinas (**figura 2**) são os glucósidos hidrossolúveis das antocianidinas, são solúveis em água e estão largamente distribuídas na natureza, em especial em grãos, flores e frutos como morango, baga de sabugueiro, mirtilo, uva vermelha, framboesa, cereja e groselha (Karakaya et al. 2016; Assous, Abdel-Hady, and Medany 2014).

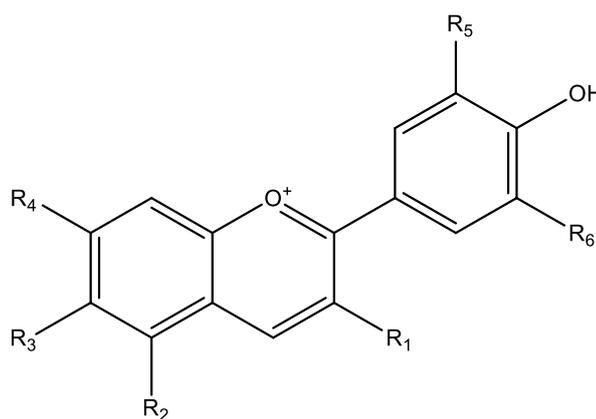


Figura 2 - Estrutura geral das antocianinas.

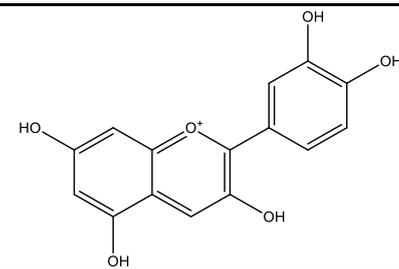
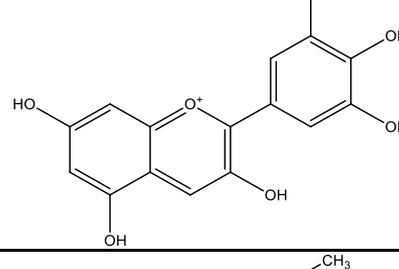
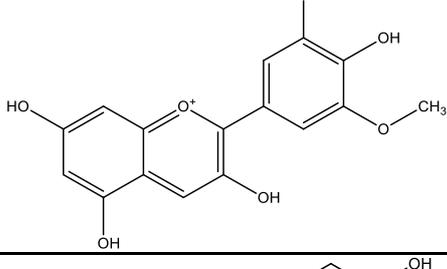
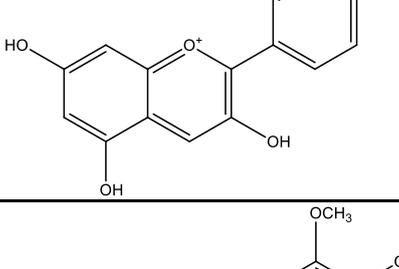
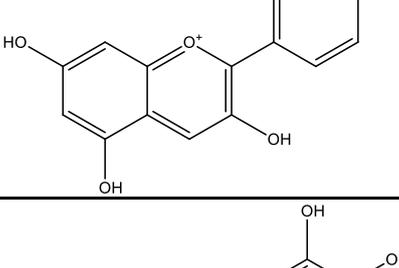
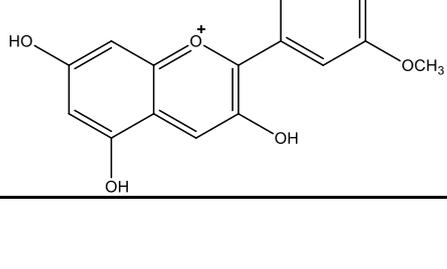
Estão associadas a vários efeitos benéficos para a saúde, em resultado da sua ação antioxidante, antimutagénica, antimicrobiana, hipocolesterolémica, anti-glicémica e antiviral (Lemos, Aliyu, and Hungerford 2012; Dudonné 2015; Assous, Abdel-Hady, and Medany 2014). Fazem parte do grupo de flavonóides com uma estrutura típica composta por um sistema benzoílo (anel-A) e um sistema hidroxicinamoílo (anel-B), obedecendo à mesma regra de numeração dos carbonos que qualquer outro flavonoide (Cunha 2014).

Para além da sua ação biológica, as antocianinas são caracterizadas por conferir diferentes cores, cuja estabilidade é no entanto afetada pelo pH, temperatura, humidade relativa, concentração, luz (UV-visível), enzimas e presença de compostos químicos como ácido ascórbico ou açúcares, dióxido de enxofre ou sulfitos, iões metálicos e co-pigmentos (Smeriglio et al. 2016; Martins et al. 2016; Zaffino et al. 2016). Além do mais, quando submetidas a processamento e armazenamento são facilmente convertidas em pigmentos castanhos poliméricos e insolúveis que se degradam rapidamente a temperaturas elevadas devido à sua alta reatividade (Karakaya et al. 2016).

A atividade biológica das antocianinas pode ser afetada pela glicosilação, o que torna a molécula mais solúvel em água, mas menos reativa em relação aos radicais livres e metais, diminuindo a sua atividade antioxidante (Garcia-Herrera et al. 2016). A previsão da libertação de nutrientes alimentares é de grande relevância para modular a sua biodisponibilidade (Karakaya et al. 2016).

Apesar de o número de antocianinas já isoladas ultrapassar as 500, a maior parte resulta da glicosilação de um grupo de seis antocianidinas, nomeadamente cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina e petunidina (Kamiloglu et al. 2015) (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Estrutura básica das principais antocianinas.

Antocianina	Esqueleto básico	Estrutura básica
Cianidina	$C_{15}H_{11}O_6^+$	
Delfinidina	$C_{15}H_{11}O_7$	
Malvidina	$C_{17}H_{15}O_7^+$	
Pelargonidina	$C_{15}H_{11}O_5^+$	
Peonidina	$C_{16}H_{13}O_6^+$	
Petunidina	$C_{15}H_{11}O_6^+$	

As antocianinas são amplamente metabolizadas durante a absorção, tendo sido detetada, após a ingestão diária de 500 mg provenientes de bagas sabugueiro ao longo de 12 semanas, a presença de 28 metabolitos na urina e 21 no plasma (Ferrars, et al., 2014).

A função mais importante das antocianinas nas plantas é a sua capacidade de conferir cor nos produtos vegetais em que ocorrem. Desta forma, devido às cores vivas e intensas que elas produzem desempenham um papel importante na atração de animais para a polinização e dispersão de sementes. Juntamente com outros flavonoides, desempenham um papel na resistência de plantas ao ataque de pragas podendo agir como antioxidantes ou como agentes antibacterianos (Novello 2011).

As cores típicas das antocianinas na sua forma natural advêm do sistema de ligações duplas conjugadas presente no 2-fenilbenzopirílio do qual derivam (Assous, Abdel-Hady, and Medany 2014), responsável pela absorção de luz a cerca de 500 nm. Podem apresentar tonalidades rosa, vermelho, violeta ou azul, dependendo da natureza química e posição de ligação das unidades glicósido e grupos acilo ligados à aglicona (Smeriglio et al. 2016).

Em todas as classes de compostos fenólicos, incluindo as antocianinas, a atividade antioxidante é elevada, mas alguns compostos em particular apresentam um potencial superior. Estas diferenças de bioatividade implicam o completo conhecimento da composição química de extratos de plantas, antes da sua utilização como aditivos alimentares utilizados com o objetivo de enriquecer as propriedades bioativas do alimento.

1.4.1. Corantes naturais

Os corantes alimentares naturais são cada vez mais populares entre os consumidores pela sua segurança, potencial funcional e biológico e potenciais efeitos na saúde (Martins et al. 2016), mantendo em simultâneo uma eficácia corante similar à dos derivados de síntese química (Carocho et al., 2014; Martins et al., 2016). Embora alguns pigmentos naturais já tenham sido utilizados como substitutos de compostos sintéticos relacionados, existe uma ampla gama de moléculas naturais sem aplicação industrial, pelo que a investigação neste campo pode representar avanços promissores no desenvolvimento de alimentos funcionais.

As antocianinas são os corantes alimentares naturais mais estudados, sendo obtidos a partir de flores, frutos, folhas e até plantas inteiras (Martins et al. 2016), e estando já

reconhecidas como antioxidantes naturais. Ainda assim, em 2013, a EFSA (European Food Safety Authority) exigiu um parecer científico sobre a segurança das antocianinas e do seu consumo como aditivo alimentar, que concluiu que deveria ser efetuada investigação adicional devido à falta de dados toxicológicos (Carocho et al., 2015; EFSA Panel on Food Additives and Nutrient, 2013).

1.5. Sabugueiro (*Sambucus nigra* L.)

O sabugueiro (*Sambucus nigra* L.) é uma árvore ou arbusto nativo da Europa, Norte de África e Ásia Ocidental e Central. Pertence à família das Adoxáceas e é também conhecido como canineiro, sabugo ou galacrista. A planta é muito ramificada, apresentando uma copa globosa que pode atingir 7 metros de altura. Cresce em bosques e terrenos não cultivados, e pode encontrar-se em sebes, margens de campos e cursos de água, em quase todo o território Português, sendo também cultivado como planta ornamental (Cunha 2011).

A floração ocorre durante o início do verão com pequenas flores brancas que criam uma umbela plana, a partir da qual é posteriormente (desde o final do verão ao início do outono) formado o fruto, que se apresenta sob a forma de bagas pretas brilhantes (**figura 3**). Este fruto maturado, que também pode ser vermelho escuro, é único entre as cerca de 25 espécies do género *Sambucus*, pelo facto de ser comestível (Diviš et al. 2015) (Divis, et al., 2015). Após a formação do fruto, as folhas deiscantes apresentam uma tonalidade amarelada (Scopeli et al. 2007).



Figura 3 - Pormenor do fruto de sabugueiro.

Em diferentes países Europeus, as flores mais velhas e as bagas servem como fonte alternativa de ingredientes na indústria de alimentos, em especial devido às suas propriedades benéficas, por exemplo para produzir tortas, geleias, gelados, iogurtes e diferentes bebidas, como vinho, chá, licor e sumos (Vlachojannis, et al., 2014; Divis, et al., 2015; Mikulic-Petkovsek, et al., 2015).

Na realidade, a espécie *S. nigra* está descrita em diversas farmacopeias, como a Alemã, Austríaca, Francesa, Holandesa, Húngara, Portuguesa, Suíça, Europeia, entre outras (Scopeli et al. 2007).

As bagas têm mesmo sido utilizadas pela medicina tradicional desde há vários séculos. Alguns estudos atuais validaram os potenciais efeitos positivos sobre a saúde humana. Contudo, as bagas verdes e outras partes da planta, como folhas, casca e sementes contêm lectinas e sambunigrina (**figura 4**), glicosídeo cianogénico que é hidrolisado no trato gastrointestinal, libertando cianeto. Isto pode provocar náuseas, vómitos e efeitos colaterais mais graves, incluindo dormência e letargia (Ulbricht et al. 2014). Além disso, existem alguns relatos de rinoconjuntivite e sintomas asmáticos após inalação ou contato com flores de sabugueiro e sumo de flores em fases de maturação mais avançada (Vlachojannis, Cameron, & Chrubasik, 2010).

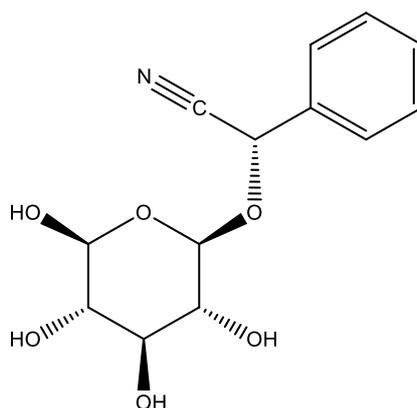


Figura 4 - Estrutura química da sambunigrina.

Parte da bioatividade da baga de sabugueiro está relacionada com o seu perfil em compostos fenólicos. No entanto, o teor destes compostos depende do tipo e genótipo do fruto, das condições de crescimento da planta, da localização geográfica e da tecnologia de processamento aplicada.

Foi já inclusivamente demonstrado que perfil de componentes bioativos e a atividade antioxidante dos extratos de baga de sabugueiro diferem substancialmente ao longo dos estágios de maturação, sendo que com a maturação a atividade, em geral, aumenta (Koss-Mikołajczyk et al. 2016; Diviš et al. 2015).

Assim, é necessário que as preparações de baga de sabugueiro sejam completamente caracterizadas, tendo em especial atenção o teor em antocianidinas, que pode ser avaliado em detalhe utilizando técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) associada a espetrometria de massa (MS) (Vlachojannis et al., 2010). Esta caracterização é imperativa para o estabelecimento de condições de produção padronizadas, em especial do sumo, que permitiria ultrapassar as limitações impostas pela sazonalidade das bagas de sabugueiro (Nowak, Goslinski, and Szwengiel 2016).

A atividade antioxidante e o poder corante das bagas de sabugueiro foram já cientificamente validadas (Senica et al. 2016a; C. Vlachojannis, Zimmermann, and Chrubasik-Hausmann 2015; Mladenka et al. 2016; Lee and Finn 2007; Buchweitz et al. 2013; Nowak, Goslinski, and Szwengiel 2016; Barros et al. 2011; Ulbricht et al. 2014; Zaffino et al. 2016), apresentando potencial para a industrialização do seu sumo, tendo em conta também o baixo custo de obtenção. O “bagaço” restante após a extração do sumo ainda mantém uma parte significativa dos compostos bioativos, podendo também ser considerado para aplicações similares.

As principais aplicações práticas das bagas de sabugueiro utilizam estes frutos sob a forma de concentrado, sumo ou infusão, tendo já sido reportada a sua ação benéfica a nível de diferentes doenças, como constipações e outras infeções do trato respiratório superior (por exemplo, sinusite bacteriana e bronquite), para além de exercer um importante efeito diurético, diaforético e analgésico (Duymuş, Göger, & Başer, 2014; Scopeli et al., 2007; Ulbricht et al., 2014; Vlachojannis et al., 2010). Para além da atividade antioxidante, outras propriedades farmacológicas como a atividade anti-inflamatória e imuno-estimulante, poderão potenciar efeitos preventivos da propagação de células tumorais (Dudonné, 2015; Duymuş et al., 2014; Mikulic-Petkovsek et al., 2014; Vlachojannis et al., 2015; Vlachojannis et al., 2010). No entanto, outros autores indicam que não existem dados clínicos suficientes para validar parte desta atividade (Smeriglio et al. 2016).

1.5.1. Compostos bioativos em bagas de sabugueiro

Dos compostos bioativos presentes na baga de sabugueiro, as antocianinas são certamente os mais importantes (Senica et al. 2016b; Krüger, Mirgos, and Morlock 2015; Szalóki-Dorkó, Stéger-Máté, and Abrankó 2016; Koss-Mikołajczyk et al. 2016; Mladenka et al. 2016; Dudonné 2015). As antocianinas presentes em maior abundância são a cianidina-3-*O*-sambubiósido (dissacárido β -D-xylosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucose) e a cianidina-3-*O*-glucósido (**figura 5**) (Garcia-Herrera et al., 2016; Mikulic-Petkovsek et al., 2014; Nowak et al., 2016; Vlachojannis et al., 2015). Outras antocianinas presentes em quantidade relevante incluem a cianidina-3-sambubiosil-5-*O*-glucósido, cianidina-3-*O*-rutinósido e a cianidina-3,5-*O*-diglucósido (de Ferrars et al. 2014; Senica et al. 2016a).

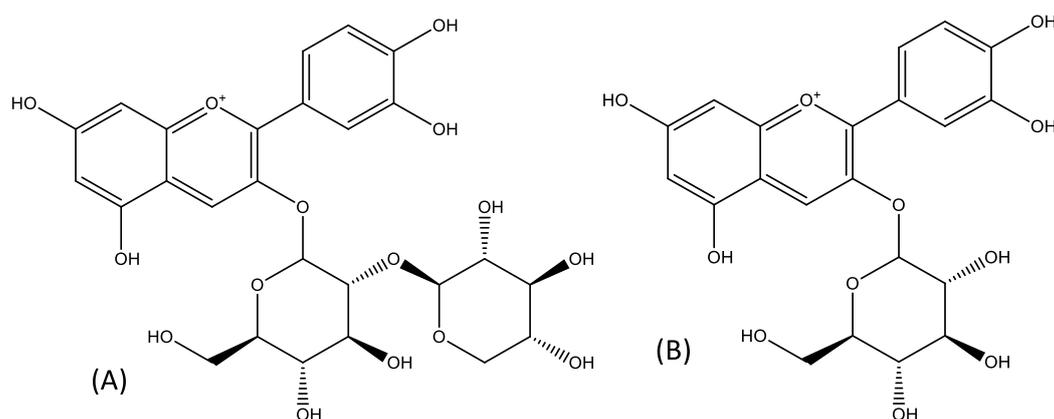


Figura 5 - Estruturas químicas da cianidina-3-*O*-sambubiósido (A) e da cianidina-3-*O*-glucósido (B).

As antocianinas são o grupo predominante de compostos nas bagas de sabugueiro (Nowak, Goslinski, and Szwengiel 2016) e podem ser uma boa escolha para a coloração de alimentos (Buchweitz et al. 2013) com um pH baixo (pela sua maior estabilidade em condições ácidas), como bebidas, conservas, gelados, compotas e geleias, molhos e produtos de confeitaria (Szalóki-Dorkó, Stéger-Máté, and Abrankó 2016). No entanto, é de notar que, comparativamente a outros sumos como o de arando ou de romã, o sumo de baga de sabugueiro é o menos ácido (Nowak, Goslinski, and Szwengiel 2016; Lee and Finn 2007), o que é um ponto positivo pois alarga a gama de produtos nos quais pode ser aplicado.

1.6. Alimentos funcionais

Hoje em dia, a satisfação do consumidor não está apenas relacionada com o sabor, aparência, cheiro e atratividade dos alimentos, mas também com o seu impacto na saúde, melhoria da qualidade de vida e longevidade, pelo que os corantes alimentares naturais, bem como outros aditivos relacionados, são considerados não apenas como agentes de melhoramento organoléptico, mas também como estimuladores do estado nutricional e promotores de saúde (Caleja et al. 2017; Martins et al. 2016).

Uma caracterização detalhada das bagas de sabugueiro, associada ao estudo das suas propriedades bioativas pode não só promover o seu consumo, como também o desenvolvimento de alimentos funcionais e nutracêuticos (Dudonné 2015), visto que a sua incorporação em alimentos pode conferir benefícios positivos à saúde (Sun-Waterhouse, Jin, and Waterhouse 2013; Krawitz et al. 2011; González-Molina et al. 2012).

1.6.1. Limitações

Não há dúvida de que a natureza é altamente rica em pigmentos e que a maioria das plantas ainda não foi explorada pelas suas capacidades de coloração. De outro modo, e apesar destes inconvenientes, a estabilidade química de numerosos pigmentos alimentares de origem natural é marcadamente afetada por vários fatores externos, já anteriormente indicados (Martins et al. 2016; Karakaya et al. 2016; Lemos, Aliyu, and Hungerford 2012).

Para além da sua riqueza em compostos antioxidantes, foi também já demonstrado que o consumo de 100 g de bagas de sabugueiro garante parte da dose dietética recomendada de cálcio, potássio, sódio, fósforo, magnésio, ferro, zinco e cobre (Diviš et al. 2015), o que é um dado muito promissor no que toca à introdução deste fruto em alimentos. Todavia, o processo de preparação para a produção de alimentos processados com as bagas pode levar à degradação dos polifenóis pois um armazenamento inadequado, sem proteção da luz, oxigénio e calor, contribui para a degradação dos componentes (Vlachoianis et al., 2015).

Esta limitação impulsiona a pesquisa de novos pigmentos alimentares de origem natural para satisfazer as expectativas dos consumidores, e a posterior implementação de técnicas mais eficazes para manter a estabilidade dos pigmentos alimentares naturais (durante o

processamento e armazenamento), garantindo assim a atratividade e bioatividade dos produtos finais (Dias, Ferreira, and Barreiro 2015; Bánvölgyi et al. 2015; Martins et al. 2016).

1.7. Incorporação de antocianinas em produtos de confeitaria

Os padrões alimentares baseados no elevado consumo de frutos e vegetais, como a dieta mediterrânica, desempenham um papel importante na proteção do equilíbrio entre estado oxidativo e defesas antioxidantes do organismo. Porém, nem todas as pessoas praticam uma dieta alimentar rica nestes alimentos, pelo que uma forma de aumentar o consumo de compostos bioativos naturais é a sua incorporação em alimentos populares entre os consumidores, tais como o pão, produtos de confeitaria ou massas (Sun-Waterhouse, Jin, and Waterhouse 2013).

A adição do sumo de baga de sabugueiro em produtos de confeitaria, poderá trazer alguns benefícios evidentes como por exemplo, o enriquecimento em fibra dietética, vitaminas, minerais e antioxidantes em produtos como pão, croissants, bolos e biscoitos, que poderão também adquirir uma aparência mais apelativa. Alguns estudos já analisaram a adição de corantes naturais em biscoitos (Caleja et al. 2017), tendo já sido verificado que cozimento de produtos de pastelaria não tem qualquer influência na estabilidade e biodisponibilidade das antocianinas (Karakaya et al. 2016).

1.7.1. Croissants

Os croissants são um alimento de alto valor nutricional, com elevados índices de consumo em muitas partes do mundo. Os ingredientes de base utilizados no fabrico de croissants são farinha de trigo, margarina, ovos, leite, sal, açúcar e fermento em pó, podendo incluir outros ingredientes adicionais (Massoud et al. 2016).

Apesar do seu valor calórico, e de um perfil lipídico dominado por ácidos gordos saturados, este produto apresenta níveis relevantes de proteína e fibra (Raposo et al. 2016; Fallaize et al. 2013; Quílez et al. 2006).

No entanto, e apesar da grande apetência dos consumidores por este produto, o croissant não tipifica, definitivamente, aquilo que pode considerar-se como um alimento promotor da saúde. A associação destes dois fatores atribui um especial interesse ao estudo

da introdução de componentes bioativos, como os que estão presentes no sumo de baga de sabugueiro.

Para além da melhoria do produto a nível do efeito fisiológico do seu consumo, a incorporação do sumo de sabugueiro conduzirá à obtenção de um produto com um aspeto inovador que potencialmente funcionará como atrativo adicional para os consumidores.

1.8. Objetivos

Os principais objetivos deste trabalho foram avaliar as propriedades corantes e bioativas de sumo de bagas de sabugueiro, bem como obter um alimento com características melhoradas, do ponto de vista nutricional e visual, pela incorporação do sumo na receita de croissants brioche.

Pretendeu-se ainda promover a aplicação alimentar do sumo e conferir-lhe rentabilidade pela sua utilização visto que é uma espécie atualmente pouco aproveitada.

Para avaliar as propriedades bioativas foram efetuados diferentes trabalhos experimentais como a avaliação da atividade antioxidante e antitumoral. A atividade antioxidante foi medida através dos ensaios do efeito captador de radicais livres (DPPH), poder redutor e inibição da descoloração do β -caroteno.

A atividade antitumoral, avaliou-se recorrendo ao ensaio colorimétrico da sulforrodamina B no sentido de estudar linhas tumorais de cancro de pulmão (NCI-H460), fígado (HepG2), mama (MCF-7) e cervical (HeLa), sendo ainda avaliada a toxicidade em células normais de fígado de porco (PLP2).

Em prol do estudo da estabilidade cromática, avaliou-se o perfil de antocianinas do sumo e nas diferentes formulações de croissants, utilizando um corante comercial como comparação. Foi ainda avaliada a composição nutricional e o perfil em açúcares livres e ácidos gordos. A coloração obtida pela incorporação de diferentes concentrações de sumo foi controlada pela avaliação dos parâmetros de cor L^* , a^* e b^* .

2. Material e Métodos

2.1. Padrões e reagentes

Os padrões utilizados na atividade antioxidante, ácido gálico, catequina, foram adquiridos à Sigma (St. Louis, MO, EUA), o 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi comprado à Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA). Todos os restantes compostos químicos e solventes eram de grau analítico tendo sido comprados a fornecedores especializados. A água foi tratada através de um sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water Systems, EUA).

Para as análises cromatográficas, o acetonitrilo (grau de pureza HPLC) foi obtido da Merck KgaA (Darmstadt, Alemanha). O ácido fórmico e o ácido trifluoroacético foram adquiridos à Prolabo (VWR International, França). Os padrões de compostos fenólicos foram fornecidos pela Extrasynthese (Genay, França).

Nos ensaios efetuados com culturas celulares, o dimetilsulfóxido (DMSO), de grau analítico, foi comprado à Fisher Scientific (Paris, França). O soro fetal bovino (FBS), a L-glutamina, a solução salina equilibrada de Hank (HBSS), as soluções de tripsina-ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (100 U/mL) e de penicilina/estreptomicina (100 mg/mL) e os meios Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 e Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) foram fornecidos pela Hyclone (Logan, EUA). Os outros componentes utilizados, ácido acético, elipticina, sulforrodamina B (SRB), azul de tripano, ácido tricloroacético (TCA) e Tris, foram comprados à Sigma Chemical Co. (Saint Louis, EUA).

2.2. Amostras

O material foi obtido por recolha direta durante o mês de setembro de 2016. As bagas foram recolhidas de acordo com a coloração (preto brilhante) correspondente ao grau de maturação completa. As amostras de sumo foram obtidas exclusivamente por pressão mecânica (sem esmagamento da semente), sendo posteriormente congeladas, liofilizadas (FreeZone 4.5 model 7750031, Labconco) e trituradas antes de serem armazenadas num local seco e ao abrigo da luz.

2.3. Avaliação da atividade antioxidante

Para testar diferentes concentrações, efetuaram-se diluições sucessivas do sumo direto, de modo a ser possível a determinação do fator de diluição correspondente a 50% da atividade total. Foram testados os ensaios do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, de determinação do poder redutor e de inibição da descoloração do β -caroteno.

2.3.1. Preparação das amostras

As amostras de sumo diluído (100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5625%, 0,78125%, 0,390625%, 0,1953125%, 0,09765625%) foram filtradas (filtros de papel Whatman nº4) e liofilizadas, sendo mantidas ao abrigo da luz e humidade até aos ensaios adicionais.

2.3.2. Atividade captadora de radicais DPPH

As amostras (30 μ L) de diferentes diluições foram colocadas (em triplicado) juntamente com uma solução de DPPH (2700 μ L, 6×10^{-5} M) em microplacas de 96 poços, deixando repousar durante 30 minutos ao abrigo da luz. A atividade foi avaliada a uma absorvância de 515 nm, num leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc) (**figura 6**).

Calculou-se a atividade captadora de radicais livres tendo em conta a percentagem de descoloração do DPPH pela seguinte equação:

$$\%RSA = \frac{A_{DPPH} - A_S}{A_{DPPH}} \times 100$$

Em que A_S é a absorvância da solução com uma determinada concentração de extrato e A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH utilizada. O fator de diluição do sumo responsável por 50% de atividade foi calculado a partir do gráfico de percentagem de RSA em função da diluição do sumo.



Figura 6 - Leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc) onde foi lida a absorvância.

2.3.3. Poder redutor

Para este método foi utilizado o leitor de microplacas indicado em 2.3.2. Às diferentes diluições do sumo (0,5 mL) foi adicionado tampão fosfato de sódio (200 mM, pH 6,6, 0,5 mL) e ferricianeto de potássio (1%, w/v, 0,5 mL). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min. Adicionou-se posteriormente ácido tricloroacético (10%, w/v, 0,5 mL). Parte (0,8 mL) do volume da anterior mistura reacional foi colocada na placa adicionando-se de seguida água desionizada (0,8 mL) e cloreto de ferro (III) (0,1%, w/v 0,16 mL). Mediu-se a absorvância a 690 nm sendo o fator de diluição do sumo com 0,5 de absorvância calculado por interpolação a partir do gráfico de absorvância a 690 nm em função da diluição da amostra.

2.3.4. Inibição da descoloração do β -caroteno

Preparou-se, por dissolução, uma solução de β -caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 mL). Pipetou-se 2 mL desta solução para um balão de fundo redondo e evaporou-se o clorofórmio a 40 °C sob vácuo. Aos 0,2 mg de β -caroteno resultantes, adicionou-se ácido linoleico (40 mg), emulsionante Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 mL), agitando vigorosamente até emulsionar.

Transferiram-se 4,8 mL desta emulsão para tubos de ensaio contendo 0,2 mL de cada uma das diluições do sumo. Os tubos foram agitados (vortex) e incubados a 50 °C em banho-maria. Logo que a emulsão foi adicionada a cada tubo, a absorvância foi medida (tempo zero) a 470 nm (espectrofotómetro AnalytikJena 200-2004) (**Figura 7**), tendo sido novamente medida no final da incubação.



Figura 7 - Espectrofotómetro AnalytikJena 200-2004 utilizado na leitura de absorvâncias

A inibição da descoloração do β -caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação: (conteúdo do β -caroteno após 2h de ensaio/conteúdo β -caroteno inicial) \times 100. O fator de diluição do sumo responsável por 50% de atividade antioxidante foi calculada por interpolação a partir do gráfico de percentagem da inibição da descoloração do β -caroteno em função da diluição da amostra.

2.4. Avaliação da atividade inibitória do crescimento de linhas celulares tumorais humanas

Neste caso, começou por fazer-se a liofilização do sumo de sabugueiro. O resíduo seco obtido foi então diluído em água, numa gama de trabalho de 6,25 até 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

O ensaio da sulforrodamina B (SRB) é um dos processos mais utilizados para o rastreio *in vitro* de citotoxicidade. Este método quantifica o número de células através de marcação do seu conteúdo proteico. Tem a vantagem de permitir estudar uma célula isolada sem a necessidade de testes em animais. No entanto, neste caso a célula age como independente, não tem agentes a atuar sobre ela, como no interior do organismo e para além disso, devido a agressões sofridas durante o processo de cultura, existe sempre a possibilidade da existência de alterações genéticas. O ensaio baseia-se na capacidade da SRB, aminoxantina com características corantes de cor rosa-brilhante, para se ligar a componentes proteicos de células, que foram fixadas em placas de cultura, com a ajuda de ácido tricloroacético (Vichai and Kirtikara 2006). Utilizaram-se as linhas tumorais HeLa (carcinoma cervical), MCF-7

(adenocarcinoma da mama), NCI-H460 (cancro do pulmão de células não-pequenas), HepG2 (carcinoma hepatocelular), sendo que foi ainda efetuado um ensaio de toxicidade com linhas celulares PLP2 (células normais de fígado de porco).

As células foram cultivadas numa incubadora de ar humidificado e com 5% de CO₂, em frascos de cultura de tecidos de 25 cm² e suplementadas com DMEM com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomomicina. Foi efetuada uma monitorização contínua das células num microscópio de contraste de fase (Icon Eclipse Ts 100). Para preparar o ensaio, começou-se por retirar o meio de cultura do frasco de cultura com as células, e lavou-se com solução salina (HBSS, 2 mL). Descartou-se o meio de lavagem e adicionou-se tripsina (2,5 mL), para desagregar as células da caixa de cultura durante três minutos em incubação. De seguida adicionou-se meio de cultura (5 mL) de modo a neutralizar a ação da tripsina, e colocou-se a suspensão da linha celular em tubos de Falcon estéreis para centrifugar (5 min). Descartou-se o meio de cultura com tripsina, e retirou-se a suspensão celular (75 µL) para um eppendorf à qual se juntou a mesma quantidade (75 µL) de azul tripano para se proceder à contagem de células numa câmara de Neubauer.

Posteriormente, colocaram-se quatro diluições das amostras (10 µL) em microplacas de 96 poços juntamente com o volume de suspensão celular calculado para a densidade estabelecida, e perfez-se o volume do poço com meio de cultura. Após isto, as microplacas armazenaram-se devidamente seladas durante 72 horas a 37 °C com humidade e 5% de CO₂.

Já com as células devidamente aderidas, desprezou-se o conteúdo da microplaca, e deu-se início ao teste da sulforrodamina B (SRB) pela adição de ácido tricloroacético frio (10%, 100 µL) a cada um dos poços e pela incubação a 4 °C por 60 minutos. Após isto, lavaram-se devidamente com água destilada e as microplacas foram colocadas a secar. Adicionou-se então a sulforrodamina B (0,1 em 1% ácido acético; 100 µL) incubando de seguida durante 30 minutos à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada, desta vez com ácido acético (1%) de modo a retirar cuidadosamente o excesso SRB e deixou-se secar. Solubilizou-se a SRB com Tris (200 µL, pH 7,4) com auxílio a um agitador de microplacas (Stat Fax-2100), e procedeu-se a leitura da absorvância no leitor de microplacas referido previamente. Os resultados foram expressos e acordo com a concentração de resíduo seco do sumo de

sabugueiro com a capacidade de inibir 50% do crescimento celular (GI_{50}). Todos estes processos e operações foram efetuados em ambiente asséptico numa câmara de fluxo laminar vertical (TLStar, AV-30/70).

2.5. Análise das antocianinas

Para analisar as antocianinas presentes no sumo de sabugueiro (e posteriormente nas amostras de croissant) extraíram-se as amostras liofilizadas (1 g) com 30 mL de metanol contendo 0,5% de TFA durante aproximadamente 1 hora e posteriormente filtraram-se através de um filtro de papel Whatman nº 4, repetindo depois o mesmo processo com os resíduos. Os extratos combinados foram evaporados a 35 °C para remover o metanol e redissolvidos em água. Na etapa de purificação, os extratos foram tratados num cartucho C18 (SepPak®Vac Phenomenex), previamente ativado com metanol e depois com água. Os açúcares e as substâncias mais polares foram removidos passando 15 mL de água e os pigmentos antociânicos foram eluídos com 5 mL de metanol/água (80:20, v/v) contendo 0,1% de TFA. O extrato metanólico foi concentrado sob vácuo, liofilizado, redissolvido em 1 mL de solução aquosa de metanol (20%) e filtrado através de um disco LC descartável de 0,22 µm para análise por HPLC acoplado a um detetor de DAD e ESI-MS (**figura 8**).



Figura 8 – Equipamento HPLC acoplado a um detetor de DAD e ESI-MS

A separação cromatográfica foi conseguida numa coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18, (3 µm, 4,6 mm x 150 mm) de fase reversa termostaticada a 35 °C. Os solventes usados foram: (A) 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) em água, (B) acetonitrilo. A eluição em

gradiente seguiu os seguintes parâmetros: 10% de B durante 3 min, de 10 a 15% de B durante 12 min, 15% de B durante 5 min, de 15 a 18% de B durante 5 min, de 18 a 30% de B durante 20 min, de 30 a 35% de B durante 5 min e de 35 a 10% durante 10 min.

O tempo total de execução resultante foi de 60 minutos, seguido por acondicionamento de coluna de 10 minutos, utilizando um caudal de 0,5 mL/min. A dupla detecção em linha foi realizada no DAD utilizando 520 nm como o comprimento de onda preferido e num espectrómetro de massa (MS) ligado ao sistema HPLC através da saída da célula DAD.

A detecção de MS foi realizada em modo positivo, utilizando um espectrómetro de massa Linear Ion Trap LTQ XL (Thermo Finnigan, San Jose, CA, EUA) equipado com uma fonte ESI. O azoto serviu como gás envolvente (50 psi), e o sistema foi operado com uma tensão de pulverização de 4,8 kV, uma temperatura de fonte de 320 °C e uma tensão capilar de 14 V.

O deslocamento da lente do tubo foi mantido a uma tensão de 75 V, tendo sido analisada a gama de massas de M/z 100 a 1500. A energia de colisão utilizada foi de 20 (unidades arbitrárias). A aquisição dos dados foi realizada com o sistema de dados Xcalibur® (Thermo Finnigan, San Jose, CA, EUA).

As antocianinas presentes nas amostras foram caracterizadas de acordo com o seu espectro UV e de massa, e tempo de retenção por comparação com padrões, quando disponíveis. Para análise quantitativa, obtiveram-se as curvas de calibração (cianindina-3-O-glucósido ($y = 243287x - 1E+06$; $R^2=0.995$; $LOD=1.3 \mu\text{g/mL}$; $LOQ=4.32 \mu\text{g/mL}$)) por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas (0,25-50 g/mL). Os resultados foram expressos em $\text{mg/g}_{\text{extrato}}$.

2.6. Preparação dos croissants

O produto eleito para a incorporação do sumo de sabugueiro foram croissants do tipo brioche. Para a sua preparação foi utilizada a seguinte receita: farinha (225 g), leite meio gordo (80 mL), fermento fresco (5 g), um ovo, uma gema de ovo, açúcar (23,5 g), sal (3 g), manteiga (32 g), óleo de girassol (18 mL) e sumo direto em diferentes percentagens, sem exceder o máximo recomendável diário de ingestão de antocianinas (500 mg), de acordo com uma ingestão prevista máxima de 150 g de croissant. Por forma a comparar a eficácia de coloração do sumo de sabugueiro, prepararam-se também croissants incorporados com um corante comercial de cenoura preta (CHR Hansen, Hoersholm, Dinamarca). O corante foi submetido a diluições sucessivas de forma a obter valores de absorvância semelhantes àqueles obtidos com as diferentes diluições de sumo de sabugueiro. Após preparação da massa em batedeira elétrica (SilverCrest, SKMP 1300 B3) esta foi colocada a fermentar (37 °C) durante uma hora. A massa foi novamente trabalhada e esticada em retângulos de 10×50×0,5 cm, a partir dos quais foram cortadas as secções triangulares para os croissants. Procedeu-se a nova fermentação pelo mesmo espaço de tempo, sendo assim obtida a massa ideal para o tipo de croissants pretendidos, croissant brioche (**figura 9**). Posto isto, bateu-se a gema de ovo e pincelou-se a parte superior dos croissants, para seguidamente serem colocados no forno pré aquecido a 180 °C num tabuleiro com papel vegetal durante 20 minutos.



Figura 9 - Exemplo de croissant preparado com 2% de sumo de sabugueiro. Da esquerda para a direita: após a primeira fermentação, após a segunda fermentação, após cozedura.

Após a cozedura, os croissants foram liofilizados para eliminar qualquer água residual e finamente triturados (20 mesh) de modo a facilitar a sua utilização nos ensaios posteriores (figura 10):



Figura 10 – Amostras dos diferentes croissants para posterior análise. CB: Croissant base, sem qualquer agente corante. CS2: Croissants com 2% de sumo de sabugueiro; CS4: Croissants com 4% de sumo de sabugueiro; CS8: Croissants com 8% de sumo de sabugueiro; CCC: Croissants com 4% de corante comercial de cenoura preta.

2.7. Caracterização química dos croissants

Os diferentes tipos de croissant preparados neste trabalho foram caracterizados quanto aos teores em humidade, cinzas, gordura, proteínas, hidratos de carbono (calculados por diferença) e correspondente valor energético [Energia, kcal = $4 \times (g_{\text{proteína}} + g_{\text{hidratos de carbono}}) + 9 \times (g_{\text{lípidos}})$]. Foram ainda avaliados os perfis em açúcares livres, ácidos gordos e antocianinas (o parâmetro mais importante tendo em vista os objetivos do trabalho). De forma a validar a alteração de cor obtida, foram também medidos os parâmetros de cor L^* (luminosidade), a^* (intensidade da cor vermelha) e b^* (intensidade da cor azul).

2.7.1. Teor de humidade

Para a determinação do teor de humidade pesou-se a amostra (1 g) preparada previamente para cadinhos previamente calcinados e pesados que foram colocados na estufa (Memmert; UNB 100-500) a 100 °C até obter um peso constante. Os resultados obtiveram-se pela seguinte expressão: $\text{Teor de humidade} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100$

Em que m_i representa a massa inicial colocada nos cadinhos, e m_f faz referência à massa após obter um peso constante.

2.7.2. Teor de cinzas

As cinzas correspondem ao resíduo inorgânico restante após a incineração de matéria orgânica. Grande parte dos resíduos inorgânicos da cinza são constituídos por potássio, sódio, cálcio e magnésio, entre outros componentes minoritários.

Para a determinação de cinzas pesou-se a amostra (250 mg) para cadinhos calcinados e pesados e introduziram-se na mufla (Lenton Thermal designs limited; ECF12/22) (**figura 11**), deixando incinerar durante uma noite (600 °C). Arrefeceram-se os cadinhos num exsicador e mediu-se o peso.

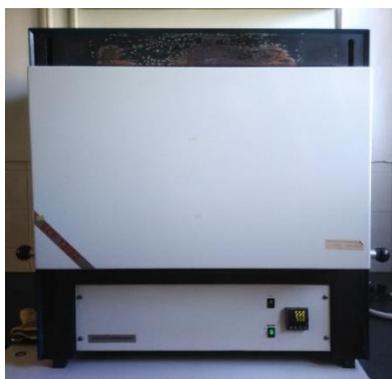


Figura 11 - Mufla (Lenton Thermal designs limited; ECF12/22) utilizada para a incineração das amostras

Os resultados foram expressos em percentagem de cinzas total, segundo a seguinte expressão: $\% \text{ cinzas} = \frac{mf}{mi} \times 100$

Em que a massa inicial é representada por mi e a massa final por mf , correspondente aos resíduos após incineração na mufla.

2.7.3. Determinação do teor em gordura

Um dos métodos mais utilizados para a quantificação do teor de gorduras em alimentos é o método de *Soxhlet* (**figura 12**). Os lípidos são extraídos a partir de uma amostra sólida consistindo num processo contínuo. A amostra (3 g) foi colocada num cartucho poroso e colocado na câmara de extração que está suspensa acima do balão que contém o solvente, e sob um condensador. O balão é aquecido e evapora o solvente que se move na fase gasosa em direção ao condensador, o qual é convertido num líquido que goteja no cartucho que contem a amostra. Deixa-se decorrer durante um tempo mínimo de 8 horas, e evapora-se o solvente.



Figura 12 - Mecanismo de Soxhlet utilizado para a extração de gorduras

O teor em gordura foi determinado após secagem na estufa a 100 °C até peso constante. Os resultados foram apresentados em percentagem de gordura, segundo a expressão:

$$\% \text{ gordura} = \frac{mf}{mi} \times 100$$

Em que a massa inicial da amostra é representada por mi e a massa final por mf , correspondente à massa de gordura obtida no balão.

2.7.4. Determinação do teor em proteína pelo método de Kjeldahl

É a partir do azoto existente nas proteínas que surge o processo mais comum para análise do teor de proteína total. O método de Kjeldahl permite quantificar o teor em proteína bruta baseado no teor em azoto da amostra. Pesou-se a amostra (1 g) previamente liofilizada e moída, e introduziu-se no tubo de digestão com 15 mL de ácido sulfúrico concentrado e duas pastilhas de selénio como catalisadores da digestão. Os tubos foram colocados no digestor (Foss™ Digestor) (**figura 13**) durante aproximadamente 2h a 410 °C.



Figura 13 - Digester (FossTM Digester) e tubos de ensaio com amostra digerida

Após arrefecimento, os tubos de digestão foram colocadas no equipamento de Kjeldahl (**figura 14**), que automaticamente realiza uma destilação e uma titulação. Inicialmente ocorre uma diluição da amostra com água e a neutralização do ácido sulfúrico com uma solução de hidróxido de sódio, posteriormente ocorre uma destilação da solução que contém o amoníaco, que o arrasta por vapor para uma outra solução, contendo ácido bórico, azul-de-metileno e vermelho de metilo, onde o amoníaco é recolhido. Dá-se então a titulação onde o ião borato, existente numa quantidade proporcional à de azoto, é titulado com uma solução padrão de ácido clorídrico, que permite calcular a quantidade molar em azoto na amostra. O teor em proteína foi depois calculado multiplicando o valor obtido para o azoto por um fator de conversão específico selecionado no aparelho, obtendo-se assim os valores em percentagem do teor de proteína.



Figura 14 - Equipamento Kjeldahl onde foram analisadas as proteínas

2.7.5. Cálculo do teor em hidratos de carbono e valor energético

Calculou-se o teor em hidratos de carbono pela diferença dos componentes averiguados anteriormente, humidade, cinzas, gordura e proteína, utilizando a seguinte expressão:

$$\% \text{ hidratos de carbono} = 100 - (\% \text{ água} + \% \text{ proteínas} + \% \text{ lípidos} + \% \text{ cinzas})$$

2.7.6. Determinação da cor

A fim de validar as alterações de cor conseguidas de acordo com as distintas percentagens de sumo, foi utilizado um colorímetro (modelo CR-400, Konica Minolta Sensing Inc., Tóquio, Japão) (**figura 15**), para medição dos parâmetros L^* , a^* e b^* (CIELAB), em que: L^* indica a luminosidade; a^* varia de valores negativos (verde) a valores positivos (vermelho) e b^* varia de azul (valores negativos) a amarelo (valores positivos) (Delgado et al. 2014).



Figura 15 - colorímetro (modelo CR-400, Konica Minolta Sensing Inc., Tóquio, Japão) utilizado para a determinação da cor dos croissants

2.7.7. Determinação do perfil de ácidos gordos por cromatografia gasosa

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa (Dani; modelo GC1000) equipado com detetor de ionização por chama (FID) a 260 °C. Após extração por Soxhlet, os ácidos gordos foram metilados com metanol:ácido sulfúrico:tolueno 2:1:1 (v:v:v) durante um período mínimo de 12 h num banho a 50 °C e 160 rpm. De seguida, foi adicionada água desionizada para promover a separação de fases e os esteres metílicos de ácidos gordos (FAME) foram recuperados com éter dietílico por agitação em vortex. O sobrenadante foi então desidratado com sódio de sulfato anidro e filtrado através de filtros de nylon (0.2 µm) para posterior injeção. A análise foi levada a cabo num cromatógrafo gasoso DANI (modelo GC 1000) equipado com um injetor split/splitless, um detetor de ionização em chama (FID) a 260 °C e uma coluna Macherey-Nagel (30 m × 0.32 mmID × 0.25 µm df) (**figura 16**).



Figura 16 - Cromatógrafo gasoso DANI (modelo GC 1000) onde se levou a cabo a determinação de ácidos gordos

O programa de temperaturas do forno foi estabelecido previamente (Pereira, Barros, Carvalho and Ferreira, 2011). A identificação foi feita por comparação dos tempos de retenção dos FAME com padrões comerciais. Os resultados foram processados com o software CSW 1.7 (DataApex 1.7) e expressos em percentagem relativa de cada aminoácido.

2.7.8. Açúcares

A composição em açúcares foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência com um detetor de índice de refração (HPLC-RI) (**figura 17**). Para isso colocou-se a amostra (1 g) num tubo de falcon, juntamente com um padrão interno, melezitose (25 mg/mL) e extraiu-se com etanol (80%, 40 mL) durante 1h30min a 80°C agitando a cada 15 min. Centrifugou-se a amostra e os vestígios de gorduras foram retirados em lavagens sucessiva com éter etílico (10 mL). Os resíduos foram dissolvidos em água para perfazer um volume final de 5 mL. A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna 100-5 NH₂ Eurospher (4,6 × 250 mm, 5 mm, Knauer) operando a 30 °C (forno Grace 7971 R). A fase móvel foi acetonitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v) com um caudal de 1 ml/min. Os açúcares foram identificados pela comparação dos tempos de retenção relativos dos picos das amostras com os padrões, e os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca.



Figura 17 – Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência com um detetor de índice de refração (HPLC-RI) utilizado para determinar a composição de açúcares.

2.8. Análise estatística

Para cada receita de croissant, foram analisadas três amostras independentes e cada amostra foi analisada em triplicado. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os testes estatísticos foram aplicados considerando um valor de $\alpha = 0,05$ (95% de confiança), utilizando o software IBM SPSS Statistics for Windows, versão 22.0. (IBM Corp., USA).

Foi feita uma análise de variância (ANOVA), com base no teste de Tukey (quando se verificou homoscedasticidade das distribuições) ou no teste de Tamhane's T2 (distribuições heteroscedásticas) para conseguir classificar as diferenças estatísticas entre os diferentes parâmetros avaliados em cada um dos croissants. O cumprimento dos requisitos da ANOVA, especificamente a normalidade da distribuição dos resultados e a homogeneidade das variâncias, foi verificado através de um teste de Shapiro Wilk e um teste de Levene, respetivamente.

3. Resultados e Discussão

3.1. Bioatividade do sumo de sabugueiro (*Sambucus nigra* L.)

Previamente à sua incorporação nos croissants, o sumo de sabugueiro foi caracterizado quanto ao seu perfil em antocianinas e ao seu potencial bioativo, em particular no tocante à atividade antioxidante e à citotoxicidade.

A primeira parte do trabalho centrou-se na determinação do fator de diluição do sumo correspondente a 50% da atividade máxima em cada um dos ensaios de atividade antioxidante. No caso do ensaio da atividade captadora de radicais livres DPPH, verificou-se uma atividade de 50% para concentração média de sumo de $3,5 \pm 0,1\%$, ou seja diluído cerca de 30x; no poder redutor o mesmo nível de atividade foi obtido para o sumo com o mesmo fator de diluição, enquanto no caso da inibição da descoloração do β -caroteno, a atividade correspondente a 50% da máxima foi conseguida com o sumo a $12 \pm 1\%$, correspondente a um fator de diluição de aproximadamente 8x.

Para além dos bons resultados na atividade antioxidante, o sumo de sabugueiro demonstrou também uma significativa citotoxicidade. Entre as linhas celulares estudadas, a linha HeLa foi a mais sensível, de acordo com o valor de GI_{50} obtido neste caso ($16 \pm 1 \mu\text{g/mL}$). Também a linha NCI-H460 demonstrou elevada suscetibilidade ($GI_{50} = 16 \pm 1 \mu\text{g/mL}$), sendo as linhas MCF-7 ($GI_{50} = 58 \pm 1 \mu\text{g/mL}$) e HepG2 ($GI_{50} = 98 \pm 4 \mu\text{g/mL}$) aquelas que demonstraram maior resistência.

Em todo o caso, a elevada bioatividade do sumo de sabugueiro ficou bem evidenciada, validando a adequação da sua escolha como um inovador aditivo com a dupla função de corar e melhorar o efeito fisiológico de alimentos preparados com a incorporação deste ingrediente natural. Uma grande parte desta bioatividade será certamente justificada pelas antocianinas presentes no sumo, identificadas na sua totalidade como sendo derivadas de cianidina, especificamente cianidina-3-*O*-sambubiósido-5-*O*-glucósido, cianidina-3-*O*-sambubiósido e cianidina-3-*O*-glucósido. A cianidina-3-*O*-glucósido foi confirmada por comparação com o padrão comercial, sendo as outras antocianinas identificadas por comparação das características cromatográficas e espectrais (UV e massa) com dados da nossa biblioteca de compostos e com a literatura disponível (Duymuş, Göger, and Başer 2014; Silva, Ferreira, and Nunes 2017).

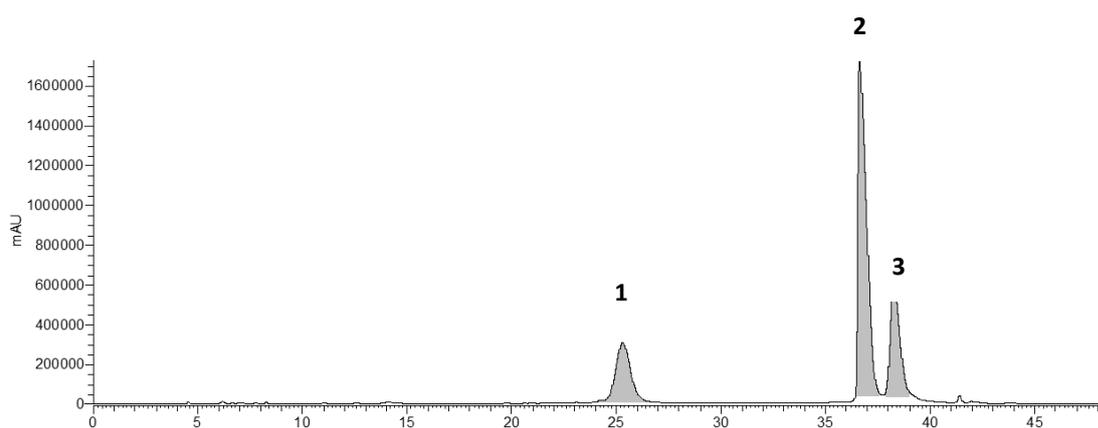


Figura 18 – Perfil cromatográfico de antocianinas da amostra de sumo de sabugueiro gravado a 520 nm.

Tabela 2 - Dados cromatográficos da identificação e quantificação de antocianinas

Pico	Rt (min)	λ_{\max} (min)	Ião Pseudomolecular [M+H] ⁺ (m/z)	Identificação	Quantificação (mg/g, dw)
1	25,31	515	581(79),449(100),287(77)	cianidina-3-O-sambubiósido-5-O-glucósido	1,5±0,2
2	36,63	517	287(100)	cianidina-3-O-sambubiósido	6,0±0,5
3	38,26	517	287(100)	cianidina-3-O-glucósido	4,2±0,5

A cianidina-3-O-sambubiósido foi a antocianina maioritária com 6,0±0,5 mg/mL de sumo, tendo a cianidina-3-O-glucósido sido quantificada em valores próximos, 4,2±0,5 mg/mL. A terceira antocianina identificada foi a cianidina-3-O-sambubiósido-5-O-glucósido, presente numa concentração de 1,5±0,2 mg/mL de sumo (**tabela 2**) (**figura 18**). Em geral, os perfis detetados, além de revelarem o elevado potencial do sumo de sabugueiro como agente de funcionalização de alimentos, estão em concordância com os resultados de estudos similares (Silva, Ferreira, and Nunes 2017).

3.2. Caracterização das novas formulações de croissant

Apesar de não existir uma dose diária recomendada bem definida para o consumo de antocianinas, existem algumas indicações para valores de cerca de 50 mg por dia. Assim, na definição das percentagens de sumo a adicionar aos croissants preparados, para além do efeito sobre a aparência visual, respeitou-se aquele limite máximo (apesar de não validado). A percentagem ensaiada mais elevada correspondeu a 8% de sumo, o que considerando que cada lote de croissants preparados tinha uma massa total final de 500 mg, correspondeu a 40 g de sumo. Estes 40 g de sumo, contêm, segundo os valores descritos em 3.1., cerca de 500 mg de antocianinas. Considerando o número médio de croissants preparados em cada lote (cerca de 40, porque foram feitos de tamanho reduzido), cada croissant continha cerca de 12,5 mg de antocianinas, podendo um adulto consumir até 4 por dia, sem ultrapassar a já referida indicação para a ingestão máxima diária destes compostos.

Além da formulação com 8% de sumo de sabugueiro (CSS8), foram preparadas mais quatro: croissants sem qualquer corante adicionado (CB), croissants com 2% de sumo de sabugueiro (CSS2), croissants com 4% de sumo de sabugueiro (CSS4) e croissants com 4% de corante comercial de cenoura preta (CCC) diluído até ter a mesma absorvância que o sumo de sabugueiro utilizado.

No seguinte esquema de imagens (**figura 19**) é possível observar a alteração de cor das massas e dos croissants, resultado da adição de sumo de sabugueiro ou corante comercial, e avaliar a estabilidade cromática ao longo das várias etapas de confeção.

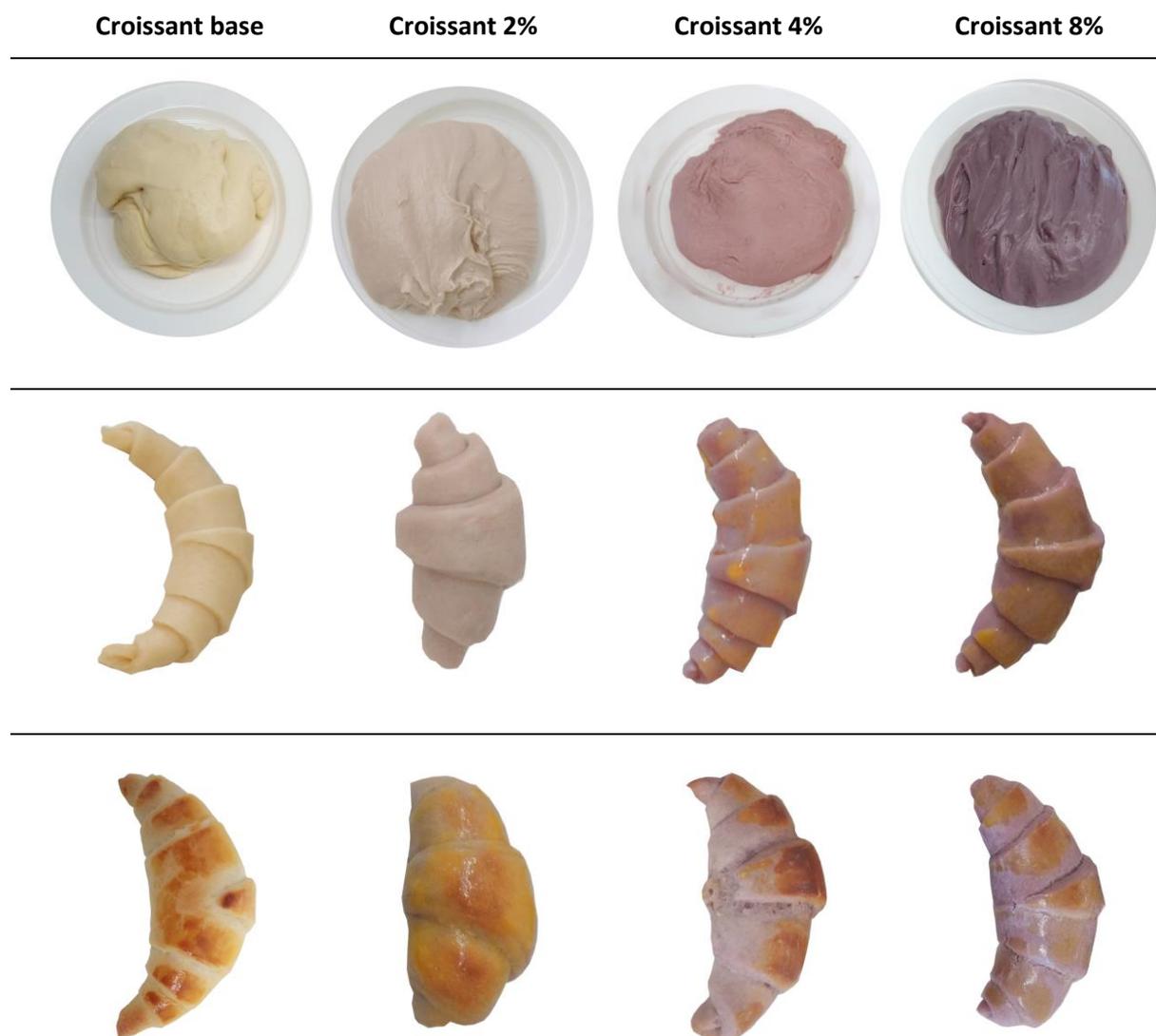


Figura 19 - Esquema representativo de diferentes etapas da confeção dos croissants. A: Massa dos croissants antes de qualquer fermentação; B: Croissants modelados antes da segunda fermentação; C: Resultado final dos croissants.

Para comparar estas diferentes formulações, foi feita a avaliação da composição nutricional, do perfil em açúcares livres e em ácidos gordos e também dos parâmetros de cor: L^* , a^* e b^* . De forma a avaliar, a eficiência de incorporação dos extratos ricos em antocianinas, os croissants foram submetidos ao mesmo processo de extração descrito em 2.5., de forma a quantificar o seu teor em antocianinas.

3.2.1. Composição nutricional

A **tabela 3** mostra os valores médios, em g/100 g de croissant, obtidos para a composição nutricional e o valor energético, em kcal/100 g. Em todos os parâmetros verificaram-se diferenças significativas (valores assinalados com letras diferentes), apesar de os resultados não terem uma variação muito relevante. Os hidratos de carbono foram o componente mais abundante, com percentagens próximas dos 70%, seguidos pela gordura (cerca de 15%) e proteínas (cerca de 10%), valores próximos dos obtidos por outros autores (Van Wymelbeke et al. 2016). O teor em água foi apenas residual, certamente em resultado do processo de cozedura a 200 °C. O valor energético é, como tipicamente associado a este tipo de produtos, elevado.

Tabela 3 - Composição nutricional (g/100 g) e valor energético (kcal/100 g) das diferentes formulações de croissants.

	Água	Gordura	Proteínas	Hidratos de carbono	Cinzas	Energia
CB	0,22±0,01 b	16,4±0,1 b	10,3±0,2 b	71±1 b	2,0±0,1 b	473±2 b
CSS2	0,21±0,01 c	14,0±0,3 c	11,0±0,1 a	73±1 a	1,4±0,1 c	464±4 c
CSS4	0,18±0,01 d	17,1±0,4 a	10,4±0,3 b	70±1 c	2,2±0,3 b	476±6 a
CSS8	0,22±0,01 b	14,1±0,1 c	11,1±0,1 a	73±1 a	1,3±0,1 c	465±2 c
CCC	0,25±0,01 a	16,5±0,2 b	10,9±0,1 a	70±1 c	2,5±0,1 a	472±2 b
Homoscedasticidade ¹ (valor de <i>p</i>) (n = 45)	<0,001	0,006	<0,001	0,012	<0,001	0,001
ANOVA ² (valor de <i>p</i>) (n = 45)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

¹Valores de *p* inferiores a 0,05 indicam distribuições heteroscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tamhane's T2. ²Como o valor de *p* é inferior a 0,05 em todos os casos, os parâmetros correspondentes apresentam diferenças significativas para pelo menos um dos tipos de croissant (identificadas com letras diferentes).

3.2.2. Açúcares livres

Os croissants apresentaram quatro açúcares livres: frutose, glucose, maltose e trealose sempre nas mesmas proporções quantitativas frutose>maltose>glucose>trealose, independentemente da formulação (**tabela 3**). Ainda assim, comparando cada açúcar livre individualmente, verificaram-se diferenças significativas entre todas as formulações testadas, apesar de, uma vez mais, os valores quantificados em cada caso serem bastante próximos. Comparando as **tabelas 3 e 4**, parece evidente que maior parte dos hidratos de carbono estará presente sob a forma de amido, uma vez que este grupo de macronutrientes representa 70% da massa dos croissants, mas os açúcares livres totais correspondem apenas a cerca de 12%.

De qualquer forma, pode dizer-se que os corantes e percentagens testados não afetaram o perfil em açúcares livres de forma relevante, o que é sempre um ponto positivo em relação à manutenção das características organolépticas deste produto.

Tabela 4- Açúcares livres (g/100 g) das diferentes formulações de croissants.

	Frutose	Glucose	Maltose	Trealose	Açúcares livres
CB	4,1±0,1 b	2,4±0,1 b	3,9±0,2 a	1,8±0,1 a	12,2±0,2 b
CSS2	5,1±0,3 a	2,7±0,3 b	3,7±0,1 b	1,6±0,1 b	13,1±0,5 ab
CSS4	5,6±0,5 a	3,4±0,5 a	3,6±0,1 b	1,4±0,1 c	14,0±0,5 a
CSS8	5,2±0,5 a	2,4±0,5 b	4,0±0,1 a	1,3±0,2 cd	12,9±0,5 ab
CCC	4,2±0,2 b	1,6±0,1 c	3,6±0,1 b	1,2±0,2 d	10,5±0,2 c
Homoscedasticidade ¹ (valor de <i>p</i>) (n = 45)	<0,001	<0,001	<0,001	0,003	<0,001
ANOVA ² (valor de <i>p</i>) (n = 45)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

¹Valores de *p* inferiores a 0,05 indicam distribuições heteroscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tamhane's T2. ²Como o valor de *p* é inferior a 0,05 em todos os casos, os parâmetros correspondentes apresentam diferenças significativas para pelo menos um dos tipos de croissant (identificadas com letras diferentes).

3.2.3. Ácidos gordos

Os ácidos gordos maioritários (abundância relativa superior a 1%) encontrados nos diferentes tipos de croissant estão listados na **tabela 5**. No entanto, deve destacar-se que para além dos tabelados, foram ainda quantificados C8:0, C11:0, C13:0, C14:1, C15:0, C17:0, C17:1, C18:2n6t, C18:3n6, C18:3n3, C20:0, C20:1, C20:2, C20:3n6, C20:3n3, C20:5n3, C22:0, C22:6n3 e C24:0, porém em todos casos em percentagens inferiores a 1%. Em relação aos ácidos gordos maioritários, foram verificadas diferenças significativas em todos os casos, sendo de assinalar as diferenças em C18:2, que apontariam o CSS2 como a melhor formulação do ponto de vista do perfil em ácidos gordos, considerando os reconhecidos efeitos benéficos deste ácido gordo. Para além do ácido oleico (cerca de 30%), o ácido linoleico (entre 20 e 30%) e o ácido palmítico (entre 17 e 24%) foram as duas formas mais abundantes.

Tabela 5- Ácidos gordos maioritários (>1%) das diferentes formulações de croissants.

	C6:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3n3	AGS	AGMI	AGPI
CB	0,9±0,1 c	1,4±0,1 c	1,9±0,1 c	5,9±0,1 c	21±1 b	1,0±0,1 d	7,0±0,1 b	28±1 cd	28±1 a	0,7±0,1 c	41±1 c	30±1 c	29±1 b
CSS2	1,3±0,1 b	1,3±0,1 c	1,7±0,3 c	4,7±0,5 d	17±1 c	1,1±0,2 cd	6,8±0,4 b	28±1 d	29±2 a	1,3±0,1 a	37±2 d	30±1 bc	33±3 a
CSS4	1,6±0,1 a	1,9±0,1 a	2,5±0,1 a	7,6±0,1 a	19±1 c	1,4±0,1 ab	8,0±0,1 a	30±1 a	22±1 b	1,3±0,1 a	44±1 b	32±1 a	24±1 c
CSS8	1,0±0,2 c	1,7±0,2 b	2,2±0,2 b	6,3±0,4 bc	24±3 a	1,3±0,1 bc	8,3±0,5 a	29±1 bc	20±2 b	1,0±0,1 b	47±2 a	31±1 b	22±2 c
CCC	1,0±0,1 c	1,8±0,2 ab	2,2±0,2 b	6,8±0,5 ab	21±1 b	1,6±0,2 a	8,3±0,4 a	29±1 ab	22±2 b	0,9±0,1 b	44±1 b	32±1 a	24±2 c
Homoscedasticidade ¹ (valor de <i>p</i>) (n = 45)	<0,001	0,003	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,001
ANOVA ² (valor de <i>p</i>) (n = 45)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,017	<0,001	<0,001	0,042	0,072	0,161	0,006	<0,001

¹Valores de *p* inferiores a 0,05 indicam distribuições heteroscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tamhane's T2. ²Como o valor de *p* é inferior a 0,05 em todos os casos, os parâmetros correspondentes apresentam diferenças significativas para pelo menos um dos tipos de croissant (identificadas com letras diferentes).

C6:0 - Ácido Caproico; **C10:0** - Ácido Cáprico; **C12:0** - Ácido Láurico; **C14:0** - Ácido mirístico; **C16:0** - Ácido Palmitico; **C16:1** - Ácido Palmitoleico; **C18:0** - Ácido esteárico; **C18:1** - Ácido Oleico; **C18:2** - Ácido Linoleico; **C18:3n3** - Ácido α-Linolénico; **AGS** - Ácidos gordos saturados; **AGM** - Ácidos gordos mono-insaturados; **AGPI** - Ácidos gordos poli-insaturados.

3.2.4. Parâmetros de cor

Considerando que um dos objetivos principais do trabalho era a obtenção de uma nova formulação de croissant com um aspeto inovador, os parâmetros de cor (**tabela 5**), nomeadamente, L^* , a^* e b^* , foram também avaliados, atendendo à sua importância óbvia. Nas amostras preparadas com sumo de sabugueiro, é notório que com o aumento da concentração de sumo, a luminosidade (L^*) tem tendência a descer; em relação a este parâmetro, os croissants controlo foram os que apresentaram maiores valores (79 ± 1), dos quais o CCC foi o que mais se aproximou (69 ± 1). Em relação à intensidade da tonalidade vermelha (a^*), o aumento da concentração de sumo de sabugueiro causou um expectável aumento, da mesma forma que o parâmetro b^* apresentou os menores valores (cor menos amarela e mais azul) também nos croissants com maior concentração de sumo, o que está de acordo com o tipo de pigmentos presentes.

Considerando os resultados obtidos, e em particular a falta de diferenças acentuadas entre CSS4 e CSS8, decidiu-se que a percentagem de 4% de sumo seria a mais adequada para este tipo de aplicação em particular.

Tabela 6- Parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) medidos no exterior e no recheio das diferentes formulações de croissants.

	L^*	a^*	b^*
CB	79±1 a	6,4±0,1 c	31±1 a
CSS2	62±1 c	8,5±0,4 b	19±1 b
CSS4	57±1 d	13,9±0,1a	12±1c
CSS8	54±1 e	14,0±0,1a	9±1d
CCC	69±3 b	8,6±0,1 b	19±1 b
Homoscedasticidade ¹ (valor de p) (n = 45)	<0,001	<0,001	<0,001
ANOVA ² (valor de p) (n = 45)	<0,001	<0,001	<0,001

¹Valores de p inferiores a 0,05 indicam distribuições heteroscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tamhane's T2. ²Como o valor de p é inferior a 0,05 em todos os casos, os parâmetros correspondentes apresentam diferenças significativas para pelo menos um dos tipos de croissant (identificadas com letras diferentes).

3.2.5. Bioatividade dos croissants preparados

De forma a controlar a manutenção da bioatividade encontrada no sumo na formulação final do croissant, foram preparados extratos (tal como descrito em 2.3.) de amostras do CSS4 para avaliar a atividade antioxidante e a citotoxicidade.

Atendendo a que os 50% de atividade nos ensaios de bloqueio de radicais DPPH e de poder redutor tinha sido conseguida com uma diluição de 30× (sumo a 3,5%), era expectável que a atividade medida no croissant se aproximasse daquela percentagem, já que o CSS4 foi preparado com 4% de sumo. Contudo, a atividade medida aproximou-se apenas dos 20% em ambos os ensaios, sendo ainda mais baixa no caso da inibição da descoloração do β -caroteno, o que também já seria de esperar, já que aquando da utilização do próprio sumo os 50% de atividade tinham sido alcançados apenas com uma concentração de 12%. De qualquer das formas, a adição do sumo é vantajosa, já que a formulação de base do croissant (CB) não apresentou qualquer atividade (até à máxima concentração ensaiada: 25 mg/mL), quando submetidas aos mesmos ensaios. De referir ainda que o aspeto dourado dos croissants (**figura 19**) após a sua preparação é o resultado da reação de Maillard e que os seus produtos de reação (melanoidinas), que são amidas cíclicas (lactamas) formadas no processo de

panificação, têm uma estrutura semelhante aos flavonoides e também possuem propriedades antioxidantes (Pisoschi and Pop 2015; Chawla, Chander, and Sharma 2009).



Figura 20 - Aspeto dourado do croissant conferido pela reação de Maillard

Por outro lado, quando os ensaios de citotoxicidade foram feitos nas amostras de CSS4, não se verificou qualquer atividade inibitória de crescimento sobre as diferentes linhas celulares ensaiadas. Isto poderá indicar que o processamento do alimento teve o efeito de neutralizar alguma substância tóxica, responsável pela citotoxicidade observadas nos ensaios com sumo de sabugueiro.

3.2.6. Estabilidade dos agentes corantes

Para além da verificação da bioatividade, também se efetuou um estudo sobre a estabilidade das antocianinas presentes no sumo de sabugueiro, em CSS4, e no extrato de cenoura preta, em CCC. Ambas as amostras foram previamente extraídas, segundo o procedimento descrito em 2.5.

A antocianina mais abundante no sumo de sabugueiro já foi identificada na secção 3.1. como sendo a cianidina-3-*O*-sambubiósido. Após efetuar uma análise cromatográfica (tal como descrito em 2.5.) numa amostra diluída do corante comercial de cenoura preta, verificou-se que a antocianina mais abundante neste caso era a feruloíl-cianidina-xilósido-glucósido-galactósido.

Desta forma, foram quantificadas nos extratos de CSS4 e CCC, as quantidades de cianidina-3-*O*-sambubiósido e de feruloíl-cianidina-xilósido-glucósido-galactósido, respetivamente. Tal como seria de esperar, em virtude do processo de cozedura a alta temperatura, o produto final não apresentava uma percentagem de antocianinas igual à dos aditivos utilizados (sumo de sabugueiro e corante comercial de cenoura), tendo em ambos os

casos havido uma redução de cerca de 50%, quer considerando a antocianina maioritária em cada caso, quer o total de antocianinas quantificadas.

Embora fosse expectável alguma degradação térmica das antocianinas, é uma vez mais possível que os extratos pudessem conter alguns açúcares remanescentes dos croissants. Apesar desta diminuição, pode obviamente considerar-se que o processo seguido teve uma dupla função de corante e agente de funcionalização, que sem dúvida acrescenta qualidade ao produto de confeitaria que era pretendido melhorar.

4. Conclusões gerais

O aproveitamento de recursos endógenos de elevado valor, em particular quando disponíveis em grande quantidade, representa uma das abordagens essenciais da aplicação de conhecimento investigacional em contextos reais, como é o caso da Indústria Alimentar.

Nesta perspetiva, este trabalho foi planeado com o objetivo principal de promover uma aplicação alimentar de uma espécie amplamente disseminada em Portugal, a *Sambucus nigra* L., em particular o sumo das suas bagas, de forma a conseguir um alimento com características melhoradas e a criar rentabilidade para esta espécie pouco aproveitada.

O sumo de bagas de sabugueiro, obtido por pressão mecânica simples, demonstrou um considerável poder antioxidante, tendo alcançado uma atividade correspondente a 50% da máxima numa concentração de $3,5 \pm 0,1\%$, nos ensaios de bloqueio dos radicais DPPH e de poder redutor, e de 12% no caso da inibição da descoloração do β -caroteno. O sumo apresentou também uma significativa citotoxicidade nas linhas celulares HeLa, NCI-H460, MCF-7 e HepG2. Além destes dois indicadores de bioatividade, o sumo foi também caracterizado em relação à sua composição em antocianinas, tendo sido quantificadas a cianidina-3-*O*-sambubiósido ($6,0 \pm 0,5$ mg/mL de sumo), a cianidina-3-*O*-glucósido ($4,2 \pm 0,5$ mg/mL) e a cianidina-3-*O*-sambubiósido-5-*O*-glucósido ($1,5 \pm 0,2$ mg/mL).

Ficando assim evidenciado o potencial bioativo e corante do ingrediente natural selecionado, procedeu-se então à sua incorporação em diferentes concentrações, numa nova formulação de um produto de confeitaria altamente apreciado: o croissant. Para ter uma ideia mais exata do verdadeiro potencial do ingrediente selecionado, foram também preparadas formulações de croissant tradicional, bem como outras incorporando corante comercial de cenoura, já utilizado noutras aplicações alimentares.

Do ponto de vista nutricional, os croissants não apresentaram uma variação muito relevante entre as diferentes formulações. Os compostos mais abundantes foram os hidratos de carbono (70%), seguidos pela gordura (15%) e proteínas (10%). Foram detetados 4 açúcares livres nos croissants: frutose, glucose, maltose e trealose, sempre com as mesmas proporções independentemente da formulação.

Entre os ácidos gordos detetados, o ácido oleico (30%), o ácido linoleico (entre 20 e 30%) e o ácido palmítico (entre 17 e 24%) foram os mais abundantes.

Em relação à bioatividade, a incorporação de sumo nos croissants permitiu uma melhoria considerável. No caso específico dos croissants preparados com 4% de sumo de sabugueiro, a percentagem que se entendeu ser a mais adequada em função dos parâmetros analisados, a atividade medida aproximou-se dos 20% no caso do bloqueio de radicais DPPH e do poder redutor, sendo mais baixa no caso da inibição da descoloração do β -caroteno, o que de qualquer forma representa um progresso apreciável, dado que o croissant base não demonstrou qualquer atividade. Por outro lado, não se verificou atividade sobre as diferentes linhas celulares ensaiadas para os croissants, talvez devido ao processamento do alimento, que pode ter contribuído para a neutralização de quaisquer componentes citotóxicos.

Em relação à aparência do produto, foi possível confirmar a alteração dos parâmetros de cor, bem como avaliar a estabilidade das antocianinas durante o processo de confeção dos croissants, que se mantiveram, após confirmação cromatográfica, numa concentração final equivalente a cerca de 50% dos valores encontrados no sumo de sabugueiro.

Em suma, a utilização do sumo como corante demonstrou ser bem sucedida, uma vez que a percentagem de antocianinas após a cocção mostrou-se semelhante à de um corante comercial, o que fornece ainda mais potencial às bagas de sabugueiro para a sua utilização industrial.

A adição do sumo faz com que estes produtos de pastelaria sejam fortificados a nível bioativo, conseguindo-se um produto muito apreciado a nível sensorial, que cumulativamente poderá exercer efeitos benéficos sobre a saúde do consumidor.

Assim, a incorporação de sumo de bagas de sabugueiro em croissants, tornou possível funcionalizar um alimento vastamente consumido, em sincronia com a alteração da sua aparência para um produto inovador e atrativo e da melhoria da sua funcionalidade fisiológica.

5. Referências bibliográficas

- Apak, R., S. Gorinstein, V. Böhm, K.M. Schaich, M. Özyürek, and K. Güçlü. 2013. "Methods of Measurement and Evaluation of Natural Antioxidant Capacity/activity (IUPAC Technical Report)*." *Pure Appl. Chem* 85 (5):957–98. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15>.
- Assous, M.T.M., M.M. Abdel-Hady, and G.M. Medany. 2014. "Evaluation of Red Pigment Extracted from Purple Carrots and Its Utilization as Antioxidant and Natural Food Colorants." *Annals of Agricultural Sciences* 59 (1):1–7. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2014.06.001>.
- Bánvölgyi, S., T. Vatai, Z. Molnár, I. Kiss, Z. Knez, G. Vatai, and M. Skerget. 2015. "Integrated Process to Obtain Anthocyanin Enriched Palm-Fat Particles from Elderberry Juice." *Acta Alimentaria*. https://www.researchgate.net/publication/277947533_Integrated_process_to_obtain_anthocyanin_enriched_palm-fat_particles_from_elderberry_juice.
- Barros, L., L. Cabrita, M.V. Boas, A.M. Carvalho, and I.C.F.R. Ferreira. 2011. "Chemical, Biochemical and Electrochemical Assays to Evaluate Phytochemicals and Antioxidant Activity of Wild Plants." *Food Chemistry* 127 (4):1600–1608. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.024>.
- Brar, S.K, G.S. Dhillon, and C.R. Soccol. 2014. *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals. Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*. Vol. 9781461480. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8005-1>.
- Bruschi, V., R. Teuber, and I. Dolgoplova. 2015. "Acceptance and Willingness to Pay for Health-Enhancing Bakery Products - Empirical Evidence for Young Urban Russian Consumers." *Food Quality and Preference* 46:79–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.07.008>.
- Buchweitz, M., J. Brauch, R. Carle, and D. R. Kammerer. 2013. "Application of Ferric Anthocyanin Chelates as Natural Blue Food Colorants in Polysaccharide and Gelatin Based Gels." *Food Research International* 51 (1):274–82. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.030>.
- Caleja, C., L. Barros, A.L. António, M.B.P.P. Oliveira, and I.C.F.R. Ferreira. 2017. "A Comparative Study between Natural and Synthetic Antioxidants: Evaluation of Their Performance after Incorporation into Biscuits." *Food Chemistry* 216:342–46.
- Carocho, M., M.F. Barreiro, P. Morales, and I.C.F.R. Ferreira. 2014. "Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12065>.
- Carocho, M., and I.C.F.R. Ferreira. 2013. "A Review on Antioxidants, Prooxidants and Related Controversy: Natural and Synthetic Compounds, Screening and Analysis Methodologies and Future Perspectives." *Food and Chemical Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>.
- Carocho, M., P. Morales, and I.C.F.R. Ferreira. 2015. "Natural Food Additives: Quo Vadis?" *Trends in Food Science and Technology* 45 (2). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.007>.
- Chawla, S. P., R. Chander, and A. Sharma. 2009. "Antioxidant Properties of Maillard Reaction Products Obtained by Gamma-Irradiation of Whey Proteins." *Food Chemistry* 116 (1):122–28. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.097>.
- Codex Alimentarius, Commission. 1995. "General Standard for Food Additives." *Codex Standard* 192:1–48. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Cunha, A.P. 2011. *Plantas E Produtos Vegetais Em Cosmética E Dermatologia*. Fundação Calouste Gulbenkian.
- Cunha, A.P. 2014. *Farmacognosia E Fitoquímica*. 4th ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

- Delgado, T., J. A. Pereira, P. Baptista, S. Casal, and E. Ramalhosa. 2014. "Shell's Influence on Drying Kinetics, Color and Volumetric Shrinkage of Castanea Sativa Mill. Fruits." *Food Research International* 55:426–35. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.043>.
- Dias, M.I., I.C.F.R. Ferreira, and M.F. Barreiro. 2015. "Microencapsulation of Bioactives for Food Applications." *Food & Function* 6 (4):1035–52. <https://doi.org/10.1039/C4FO01175A>.
- Diviš, P., J. Pořízka, M. Vespalcová, A. Matějček, and J. Kaplan. 2015. "Elemental Composition of Fruits from Different Black Elder (Sambucus Nigra L.) Cultivars Grown in the Czech Republic." *Journal of Elementology* 20 (3):549–57.
- Dudonné, S. 2015. "Comprehensive Analysis of Phenolic Compounds and Abscisic Acid Profiles of Twelve Native Canadian Berries." *Journal of Food Composition and Analysis* 44:214–24.
- Duymuş, H.G., F. Göger, and K.H.C. Başer. 2014. "In Vitro Antioxidant Properties and Anthocyanin Compositions of Elderberry Extracts." *Food Chemistry* 155:112–19. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.028>.
- EFSA Panel on Food Additives and Nutrient. 2013. "Scientific Opinion on the Re-Evaluation of Anthocyanins (E 163) as a Food Additive." *EFSA Journal* 11 (4):3145. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3145>.
- Fallaize, R., L. Wilson, J. Gray, L.M. Morgan, and B.A. Griffin. 2013. "Variation in the Effects of Three Different Breakfast Meals on Subjective Satiety and Subsequent Intake of Energy at Lunch and Evening Meal." *European Journal of Nutrition* 52 (4):1353–59. <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0444-z>.
- Ferrars, R.M. de, A. Cassidy, P. Curtis, and C.D. Kay. 2014. "Phenolic Metabolites of Anthocyanins Following a Dietary Intervention Study in Post-Menopausal Women." *Molecular Nutrition and Food Research* 58 (3):490–502. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300322>.
- Ferreira, I.C.F.R., and R.M.V. Abreu. 2007. "Stress Oxidativo, Antioxidantes E Fitoquímicos." *Bioanálise* 2:32–39. https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/2711/1/Publicação_Nacional_Sress_oxidativo.pdf.
- Food and Drug Administration of the United States of America. 2010. "FDA." 2010. <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm094211.htm#foodadd>.
- García-Herrera, P., M.L. Pérez-Rodríguez, T. Aguilera-Delgado, M.J. Labari-Reyes, B. Olmedilla-Alonso, M. Camara, and S. de Pascual-Teresa. 2016. "Anthocyanin Profile of Red Fruits and Black Carrot Juices, Purees and Concentrates by HPLC-DAD-ESI/MS-QTOF." *International Journal of Food Science and Technology* 51 (10):2290–2300. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13210>.
- González-Molina, E., A. Gironés-Vilaplana, P. Mena, D.A. Moreno, and C. García-Viguera. 2012. "New Beverages of Lemon Juice with Elderberry and Grape Concentrates as a Source of Bioactive Compounds." *Journal of Food Science* 77 (6):C727–33. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02715.x>.
- Gülçin, I. 2012. "Antioxidant Activity of Food Constituents: An Overview." *Archives of Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>.
- Kamiloglu, S., A.A. Pasli, B. Ozcelik, J. Van Camp, and E. Capanoglu. 2015. "Colour Retention, Anthocyanin Stability and Antioxidant Capacity in Black Carrot (Daucus Carota) Jams and Marmalades: Effect of Processing, Storage Conditions and in Vitro Gastrointestinal Digestion." *Journal of Functional Foods* 13:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.021>.

- Karakaya, S., S. Simsek, A.T. Eker, C. Pineda-Vadillo, D. Dupont, B. Perez, B. Viadel, et al. 2016. "Stability and Bioaccessibility of Anthocyanins in Bakery Products Enriched with Anthocyanins." *Food Funct.* 7 (8):3488–96. <https://doi.org/10.1039/C6FO00567E>.
- Koss-Mikołajczyk, I., A. Lewandowska, T. Pilipczuk, B. Kuznierewicz, and A. Bartoszek. 2016. "Composition of Bioactive Secondary Metabolites and Mutagenicity of Sambucus Nigra L. Fruit at Different Stages of Ripeness." *Acta Alimentaria* 45 (3):443–52. <https://doi.org/10.1556/066.2016.45.3.16>.
- Krawitz, C., M.A. Mraheil, M. Stein, C. Imirzalioglu, E. Domann, S. Pleschka, and T. Hain. 2011. "Inhibitory Activity of a Standardized Elderberry Liquid Extract against Clinically-Relevant Human Respiratory Bacterial Pathogens and Influenza A and B Viruses." *BMC Complementary and Alternative Medicine* 11 (1):16. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-16>.
- Krüger, S., M. Mirgos, and G. E. Morlock. 2015. "Effect-Directed Analysis of Fresh and Dried Elderberry (Sambucus Nigra L.) via Hyphenated Planar Chromatography." *Journal of Chromatography A* 1426:209–19. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.021>.
- Lee, J., and C.E. Finn. 2007. "Anthocyanins and Other Polyphenolics in American Elderberry (Sambucus Canadensis) and European Elderberry (S. Nigra) Cultivars." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87 (14):2665–75. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3029>.
- Lemos, M.A., M.M. Aliyu, and G. Hungerford. 2012. "Observation of the Location and Form of Anthocyanin in Purple Potato Using Time-Resolved Fluorescence." *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 16:61–68. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.04.008>.
- Lichtenberg, D., and I. Pinchuk. 2015. "Oxidative Stress, the Term and the Concept." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 461 (3):441–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.062>.
- Martins, N., L. Barros, and I.C.F.R. Ferreira. 2016. "In Vivo Antioxidant Activity of Phenolic Compounds: Facts and Gaps." *Trends in Food Science and Technology*, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.008>.
- Martins, N., C.L. Roriz, P. Morales, L. Barros, and I.C.F.R. Ferreira. 2016. "Food Colorants: Challenges, Opportunities and Current Desires of Agro-Industries to Ensure Consumer Expectations and Regulatory Practices." *Trends in Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.03.009>.
- Massoud, R., K. Khosravi-Darani, F. Nakhsaz, and L. Varga. 2016. "Evaluation of Physicochemical, Microbiological and Sensory Properties of Croissants Fortified with Arthrospira Platensis (Spirulina)." *Czech Journal of Food Science* 4:350–55.
- Mikulic-Petkovsek, M, V. Schmitzer, A. Slatnar, B. Todorovic, R. Veberic, F. Stampar, and A. Ivancic. 2014. "Investigation of Anthocyanin Profile of Four Elderberry Species and Interspecific Hybrids." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (24):5573–80. <https://doi.org/10.1021/jf5011947>.
- Mladenka, P., M. Ríha, J. Martin, B. Gorová, and A. Matejíček. 2016. "Fruit Extracts of 10 Varieties of Elderberry (Sambucus Nigra L.) Interact Differently with Iron and Copper." *Phytochemistry Letters* 18:232–38. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.10.025>.
- Msagati, T.A.M. 2012. *Chemistry of Food Additives and Preservatives. Chemistry of Food Additives and Preservatives*. <https://doi.org/10.1002/9781118274132>.
- Novello, A.A. 2011. "Extração de Antocianinas E a Sua Atuação Como Antioxidante E Antiaterogénica."

- Nowak, D., M. Goslinski, and A. Szwengiel. 2016. "Multidimensional Comparative Analysis of Phenolic Compounds in Organic Juices with High Antioxidant Capacity." *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8089>.
- Pereira, C., L. Barros, A.M. Carvalho, and I.C.F.R. Ferreira. 2011. "Nutritional Composition and Bioactive Properties of Commonly Consumed Wild Greens: Potential Sources for New Trends in Modern Diets." *Food Research International* 44. Elsevier Ltd:2634–40.
- Pisoschi, A.M., and A. Pop. 2015. "The Role of Antioxidants in the Chemistry of Oxidative Stress: A Review." *European Journal of Medicinal Chemistry* 97:55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>.
- Prieto, M. A., I. Rodríguez-Amado, J. A. Vázquez, and M. A. Murado. 2012. "β-Carotene Assay Revisited. Application to Characterize and Quantify Antioxidant and Prooxidant Activities in a Microplate." In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60:8983–93. <https://doi.org/10.1021/jf302218g>.
- Quílez, J., J.A. Ruiz, G. Brufau, and M. Rafecas. 2006. "Bakery Products Enriched with Phytosterols, α-Tocopherol and β-Carotene. Sensory Evaluation and Chemical Comparison with Market Products." *Food Chemistry* 94 (3):399–405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.029>.
- Raposo, A., C. Carrascosa, E. Pérez, A. Tavares, E. Sanjuán, P. Saavedra, and R. Millán. 2016. "Vending Machine Foods: Evaluation of Nutritional Composition." *Italian Journal of Food Science* 28 (3):448–63.
- Scopeli, M., E. Nunes, M. Vignoli-Silva, G.S. Vendruscolo, Amélia T. Henriques, and Lilian A. Mentz. 2007. "(Caprifoliaceae) Utilizadas Como Medicinais No Brasil." *Revista Brasileira de Farmacognosia*, no. 17.
- Senica, M., F. Stampar, R. Veberic, and M. Mikulic-Petkovsek. 2016a. "Processed Elderberry (Sambucus Nigra L.) Products: A Beneficial or Harmful Food Alternative?" *LWT - Food Science and Technology* 72:182–88. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.056>.
- Senica, M., F. Stampar, R. Veberic, and M. Mikulic-Petkovsek. 2016b. "The Higher the Better? Differences in Phenolics and Cyanogenic Glycosides in Sambucus Nigra Leaves." *Journal of Science Food Agricultural*.
- Silva, P., S. Ferreira, and F.M. Nunes. 2017. "Elderberry (Sambucus Nigra L.) by-Products a Source of Anthocyanins and Antioxidant Polyphenols." *Industrial Crops and Products* 95:227–34. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.018>.
- Smeriglio, A., D. Barreca, E. Bellocco, and D. Trombetta. 2016. "Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins." *Phytotherapy Research*. <https://doi.org/10.1002/ptr.5642>.
- Sun-Waterhouse, D., D. Jin, and G.I.N. Waterhouse. 2013. "Effect of Adding Elderberry Juice Concentrate on the Quality Attributes, Polyphenol Contents and Antioxidant Activity of Three Fibre-Enriched Pastas." *Food Research International* 54 (1):781–89. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.035>.
- Szalóki-Dorkó, L., M. Stéger-Máté, and L. Abrankó. 2016. "Effects of Fruit Juice Concentrate Production on Individual Anthocyanin Species in Elderberry." *International Journal of Food Science and Technology* 51 (3):641–48. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13031>.
- Ulbricht, C., E. Basch, L. Cheung, H. Goldberg, P. Hammerness, R. Isaac, K.P.S. Khalsa, et al. 2014. "An Evidence-Based Systematic Review of Elderberry and Elderflower (Sambucus Nigra) by the Natural Standard Research Collaboration." *Journal of Dietary Supplements* 211 (June 2015):140110103738004. <https://doi.org/10.3109/19390211.2013.859852>.

- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser. 2007. "Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (39):44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.
- Vichai, V., and K. Kirtikara. 2006. "Sulforhodamine B Colorimetric Assay for Cytotoxicity Screening." *Nature Protocols* 1 (3):1112–16. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>.
- Vizzotto, M., A.C. Krolow, and G.E. Bruch. 2010. "Metabólitos Secundários Encontrados Em Plantas E Sua Importância." *Embrapa Clima Temperado*.
- Vlachojannis, C., B.F. Zimmermann, and S. Chrubasik-Hausmann. 2015. "Quantification of Anthocyanins in Elderberry and Chokeberry Dietary Supplements." *Phytotherapy Research* 29 (4):561–65. <https://doi.org/10.1002/ptr.5284>.
- Vlachojannis, J. E., M. Cameron, and S. Chrubasik. 2010. "A Systematic Review on the Sambuci Fructus Effect and Efficacy Profiles." *Phytotherapy Research*. <https://doi.org/10.1002/ptr.2729>.
- Williamson, G., and M.N. Clifford. 2010. "Colonic Metabolites of Berry Polyphenols: The Missing Link to Biological Activity?" *The British Journal of Nutrition* 104 Suppl:S48–66. <https://doi.org/10.1017/S0007114510003946>.
- Wymelbeke, V. Van, L. Brondel, F. Bon, I. Martin-Pfitzenmeyer, and P. Manckoundia. 2016. "An Innovative Brioche Enriched in Protein and Energy Improves the Nutritional Status of Malnourished Nursing Home Residents Compared to Oral Nutritional Supplement and Usual Breakfast: FARINE+ Project." *Clinical Nutrition ESPEN* 15:93–100. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2016.06.012>.
- Zaffino, C., S. Bruni, B. Russo, R. Pilu, C. Lago, and G.M. Colonna. 2016. "Identification of Anthocyanins in Plant Sources and Textiles by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)." *Journal of Raman Spectroscopy* 47 (3):269–76.