

XIV



ENCONTRO DE QUÍMICA DOS ALIMENTOS

6-9 NOVEMBRO, 2018 VIANA DO CASTELO



XIV Encontro de Química dos Alimentos

Indústria, Ciência, Formação e Inovação



LIVRO DE ATAS DO CONGRESSO

6 a 9 de novembro de 2018

Viana do Castelo, Portugal

Ficha técnica

N. DL: **447939/18**
Nome fornecedor: IPVC - INSTITUTO POLITÉCNICO DE VIANA DO CASTELO
Título: Livro de Atas do XIV Encontro de Química dos Alimentos Indústria, Ciência, Formação e Inovação
Autor: Comissão organizadora
Tipo: Monografia
Editor: Comissão Organizadora
Local de Publicação: Viana do Castelo
Data prevista de publicação (mês/ano): 11/2018
Nº de Edição: 1ª edição
Estado: Atribuído
Atribuído em: 2018-10-29
Criado a: 2018-10-29

ISBN: **978-989-98936-9-6**

Esta publicação reúne as comunicações apresentadas no XIV Encontro de Química dos Alimentos sob a forma de ata científica. O conteúdo dos textos compilados é da inteira responsabilidade dos seus autores.

Nota de Abertura

XIV Encontro de Química dos Alimentos

O XIV Encontro de Química dos Alimentos (XIV EQA) foi organizado pelo Instituto Politécnico de Viana do Castelo, e decorreu nas instalações da Escola Superior de Tecnologia e Gestão, na cidade de Viana do Castelo, entre os dias 6 e 9 de Novembro de 2018. Este encontro, que se realiza bianualmente sob a égide da Divisão de Química dos Alimentos, da Sociedade Portuguesa de Química (SPQ), é um dos poucos fóruns nacionais onde a indústria e a ciência alimentares se podem cruzar de forma regular para um debate de ideias e conhecimento mútuo.

A Divisão de Química dos Alimentos da SPQ é uma das poucas organizações de carácter nacional que, reunindo investigadores oriundos de diversas áreas do saber, permite uma ampla discussão entre a química, a ciência, a tecnologia e a engenharia alimentares. Por essa razão, o Encontro de Química dos Alimentos tem vindo a tornar-se um dos mais importantes fóruns nacionais onde se cruzam investigadores das mais diversas proveniências e onde se debatem e potenciam as múltiplas facetas pelas quais o alimento pode ser estudado.

O XIV EQA foi organizado de modo a permitir às indústrias verificar o que de mais recente se faz em Portugal ao nível da investigação científica na área alimentar e simultaneamente permitir aos investigadores inteirar-se das necessidades de desenvolvimento do sector industrial, promovendo e facilitando colaborações cada vez mais necessárias.

O XIV EQA contou com workshops pré-evento, no dia 6 (que antecedem a recepção). No dia 7, sob o tema "um dia com a indústria", colaboradores da indústria e afins expuseram projectos de desenvolvimento e necessidades de colaborações com o sector científico nacional. No dia 8 do Encontro, sob o tema "um dia com a ciência", os investigadores apresentaram os seus mais recentes desenvolvimentos científicos e tecnológicos e avaliaram possibilidades de implementação das suas descobertas nas indústrias alimentares. O encerramento do Encontro, sob o tema "sessão formação e inovação", foi dedicado à análise e discussão da formação na área alimentar em Portugal.

A Comissão Organizadora do
XIV Encontro de Química dos Alimentos

**XIV Food Chemistry Meeting
6-9 November, Viana do Castelo, Portugal**

The XIV Food Chemistry Meeting (XIV EQA) was organized by the Polytechnic Institute of Viana do Castelo, and took place at the premises of the Superior School of Technology and Management, in the city of Viana do Castelo, from 6 to 9 November 2018. This biannual meeting, held under the aegis of the Food Chemistry Division of the Portuguese Chemistry Society (SPQ), is one of the few national forums where the food industry and food science can meet regularly for an exchange of ideas and mutual knowledge.

SPQ's Food Chemistry Division is one of the few national-level organizations that brings together researchers from diverse fields of knowledge, allowing a broad discussion of chemistry, science, technology and food engineering. For this reason, the Food Chemistry Meeting has become one of the most important national forums where researchers from a wide range of backgrounds come together, debate and empower the multiple aspects through which food can be studied.

The XIV EQA was organized in such a way as to enable industries to verify what is new in Portugal in terms of scientific research in the food area and to enable researchers to learn about the development needs of the industrial sector by promoting and facilitating increasingly needed collaborations.

The XIV EQA had "pre-event workshops" on the 6th of November (before the reception). On the 7th, under the theme "A day with the industry", industry and related collaborators exposed development projects and collaboration needs with the national scientific sector. On the third day, under the theme "A day with science", researchers presented their latest scientific and technological developments and evaluated the possibilities of implementing their findings in the food industries. The closing session, under the theme "training session and innovation", was dedicated to the analysis and discussion of training in the food sector in Portugal.

The organizing committee of the
XIV Meeting of Food Chemistry

ORGANIZAÇÃO

Manuel Rui Alves ESTG-IPVC
Manuela Vaz Velho ESTG-IPVC

COMISSÃO ORGANIZADORA

Ana Paula Vale ESA-IPVC
Carla Barbosa IPVC - ESTG-IPVC
Maria Alberta Araújo ESTG-IPVC
Mário Barros ESTG-IPVC
Preciosa Pires ESTG-IPVC
Rita Pinheiro ESTG-IPVC
Susana Rocha ESTG-IPVC

COMISSÃO CIENTÍFICA

Ada Rocha FCNAUP
Amélia Pilar Rauter FC - Universidade de Lisboa
Anabela Raymundo ISA- Universidade de Lisboa
António Vicente Universidade do Minho
Cristina Delerue-Matos Instituto Superior de Engenharia do Porto - IPP
Fernando Nunes UTAD
Fernando Ramos FF – U. de Coimbra
Isabel C.F.R. Ferreira ESA-IPBragança/CIMO
Isabel Saraiva de Carvalho Universidade do Algarve
Isabel Coelho FCT – U. Nova de Lisboa
Isabel Sousa ISA- Universidade de Lisboa
Joana S. Amaral ESTiG-IPB /REQUIMTE
José Teixeira DEB-UM
M. Beatriz P.P. Oliveira FF-UP/REQUIMTE
Manuel A. Coimbra Universidade de Aveiro
Manuela Pintado ESB-UCP
Silvina Palma ESA-IPBeja
Victor Freitas FCUP
Manuel Rui Alves ESTG-IPVC
Manuela Vaz Velho ESTG-IPVC
Xavier Malcata DEQ - Universidade do Porto

SECRETARIADO - SPQ

Cristina Campos
Leonardo Mendes

| | |
|---|-----------|
| INDÚSTRIA E NOVAS ABORDAGENS DOS SISTEMAS ALIMENTARES | 10 |
| Indústria 4.0 | 11 |
| Variation in the amino acids profile and L-theanine of different parts of Azorean Camellia sinensis shoots..... | 12 |
| Colagens emergentes: influência na composição fenólica e características organoléticas dos vinhos | 16 |
| Novos potenciais para os produtos secundários da produção..... | 20 |
| Adding Value to Agrifood By-Products as Therapeutic Alternatives: A Case Study of Herbal Medicine Research | 21 |
| Obtenção de um concentrado de cafeína a partir da pele de prata do café | 26 |
| Sementes de Melão: Potencial como Ingrediente Alimentar | 30 |
| Teores de Vitamina C do Figo-da-Índia e da Anona: Comparação entre polpa e subprodutos ... | 34 |
| Integração de processos de membrana na valorização de soro de cabra | 38 |
| Characterization of concentrated second cheese whey | 42 |
| Rendimento da extração e atividade antioxidante de extratos de casca de pinheiro (<i>Pinus pinaster</i> Aiton subsp. <i>Atlantica</i>): efeito do solvente e método de extração | 46 |
| Sucessos e insucessos na cooperação entre indústria e ciência | 50 |
| Contributo para a implementação da Norma BRC Food numa indústria de carnes..... | 51 |
| Otimização da gestão de silos de um processo produtivo de massas alimentícias bicolores, tricolores ou quadricolores secas..... | 55 |
| CIÊNCIA E INOVAÇÃO | 59 |
| Avanços no processamento de alimentos e impacto na saúde e sociedade | 60 |
| Alimentos processados: avaliação da conformidade da rotulagem | 61 |
| Newfood Project - food technologies valorization in traditional foods sector..... | 65 |
| <i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull: composição nutricional e caracterização do perfil fenólico | 69 |
| Portuguese olive oils and table olive with quality certification schemes: achievements and needs | 73 |
| Serpa PDO cheese: towards identification of chemical markers involved in organoleptic attributes | 77 |
| Características físico-químicas da farinha alimentar da couve “Penca da Póvoa” (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>Costata</i>), obtida a partir de diferentes métodos de secagem..... | 81 |
| Efeito da secagem por convecção e liofilização nas propriedades físico-químicas de vegetais desidratados: pepino (<i>Cucumis sativus</i>) e curgete (<i>Cucurbita pepo</i> L.) | 85 |

| | |
|---|------------|
| Assessment of functional properties and determination of pharmaceuticals in subcritical water extracts from two seaweeds | 90 |
| AVALIAÇÃO DO pH NA TRANSFORMAÇÃO DO MÚSCULO EM CARNE BOVINA | 94 |
| Optimization and development of analytical methods for the determination of new brominated flame retardants and polybrominated diphenyl ethers in chili peppers | 98 |
| Estudo dos efeitos da digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> e fermentação colônica em extratos fenólicos e bioatividades de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. | 102 |
| Determination of benzoic acid and sorbic acid in foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV detection..... | 107 |
| Evaluation of natural extracts as potential enzymatic browning inhibitors | 112 |
| Impact of addition of pomegranate peel extract and high-pressure on carrot juice preservation: quality, safety and sensorial aspects..... | 116 |
| Use Of Digital Image Analysis For Monitoring The Ripening Of Pdo Serpa Cheese | 121 |
| Effect of shoot maturity and different withering duration on the catechins and xanthines contents of tea from Azorean <i>Camellia sinensis</i> | 123 |
| Variability of catechins and xanthines contents on tea from different parts of Azorean <i>Camellia sinensis</i> | 127 |
| Maximização da extração de antocianinas de <i>Hibiscus sabdariffa</i> por diferentes métodos para obtenção de corantes alimentares | 131 |
| Quantification of L-theanine in Azorean green and black tea: psychoactive amino acid with beneficial impact on cognitive functions | 135 |
| Avaliação do perfil fenólico de duas plantas comumente utilizadas na medicina tradicional, após aplicação de irradiação ionizante | 139 |
| Gastrointestinal Absorption of Anthocyanins: A Molecular Approach..... | 143 |
| Physical and Chemical Characterization of Anthocyanins from Purple-Fleshed Sweet Potato.. | 146 |
| <i>Gomphrena globosa</i> L.: otimização do processo de extração de corantes, avaliação da sua atividade antimicrobiana e incorporação numa matriz alimentar | 150 |
| A multi-spectroscopic and thermodynamic study on the interaction of food polyphenols with gluten reactive peptides: from chemistry to health implications..... | 154 |
| Interação de uma mistura de procianidinas com saliva humana de diferentes indivíduos | 157 |
| Incorporation of <i>Spirulina</i> and <i>Himanthalia elongata</i> algae in integral pasta: a real protein meal | 161 |
| Detection of γ -glutamyl-S-ethenyl cysteine in <i>Vicia narbonensis</i> L.: improvement of the extraction process | 166 |
| Avanços dos sistemas alimentares integrados com o ambiente | 170 |
| LIGNIN nanoparticles loaded with bluish pyranoanthocyanin pigments. Increased stability in aqueous systems. | 171 |
| Phenolic profile of different <i>Cichorium spinosum</i> L. ecotypes..... | 175 |
| Composição nutricional e atividade antioxidante de macroalgas vermelhas provenientes de aquacultura sustentável | 179 |
| Effect of ion exchange resins on white and red wine pH: Impact on wine sensory characteristics | 183 |
| Tartrate stabilisation of rosé wine using ion exchange resins: Impact on wine sensory characteristics..... | 187 |
| Aplicação em waffles de um corante natural obtido de frutos de <i>Arbutus unedo</i> L. | 191 |

| | |
|---|-----|
| <i>Coix lachryma-jobi</i> : A new promising cereal as functional food with important nutritional value | 195 |
| Increased accumulation of anthocyanins in vine stems upon chitosan application: alternate use of winery waste produce to extract natural colour additives for the food industry | 199 |
| Variedade portuguesa de maçã “Bravo de Esmolfe” como fonte de compostos bioativos com propriedades antioxidantes e antibacterianas | 203 |
| Desenvolvimento de novos produtos alimentares com corantes naturais obtidos a partir de flores comestíveis | 208 |
| Chemical features of green fig pulp and peel: phenolic, organic acids, and tocopherols profile | 212 |
| Avanços em metodologias investigacionais | 216 |
| Effect of foliar mitigation treatments on Touriga Nacional grape berry quality | 217 |
| Extração de taninos para a produção de coagulantes naturais a partir de acácia (<i>Acacia dealbata</i>) e pinheiro (<i>Pinus pinaster</i>) | 221 |
| FORMAÇÃO PARA A ÁREA ALIMENTAR | 225 |
| Cooperação academia/indústria no desenvolvimento de modelos educacionais | 226 |
| Descodificar os “E”: plataforma online de acesso aberto de aditivos alimentares | 227 |
| Apoios | 231 |

INDÚSTRIA E NOVAS ABORDAGENS DOS SISTEMAS ALIMENTARES

Indústria 4.0

Variation in the amino acids profile and L-theanine of different parts of Azorean *Camellia sinensis* shoots

Lisete Paiva^{a,b,}, Elisabete Lima^{b,c}, Madalena Motta^a, José Baptista^{b,c}*

^aPlantações de Chá Gorreana, Gorreana, Maia, S. Miguel, Azores, Portugal

^bBiotechnology Centre of Azores (CBA), University of Azores, Ponta Delgada, S. Miguel, Azores, Portugal

^cInstitute of Agricultural and Environmental Research and Technology (IITAA), University of Azores, Ponta Delgada, S. Miguel, Azores, Portugal

*lisete.s.paiva@uac.pt

Keywords: human health; *Camellia sinensis*; L-theanine; amino acids; HPLC/DAD

ABSTRACT

This study determines, for the first time, the amino acids (AA) profile, including L-theanine, in different parts of Azorean *Camellia sinensis* using HPLC/DAD, in order to find the best blend that leads to the highest benefit for human health. The results, on a dry weight basis, showed that theanine, asparagine, histidine, glutamic acid, methionine and phenylalanine were the major AA in various parts of *C. sinensis*. High theanine content was observed in internodes (17 mg/g), followed by the combination of bud, 1st, 2nd leaves and internodes (10.59 mg/g) and bud, 1st, 2nd, 3rd leaves and internodes (8.78 mg/g), and the lower value in the combination of bud, 1st and 2nd leaves (1.74 mg/g). Histidine also present higher values in internodes (13.73 mg/g), followed by the combination of bud, 1st, 2nd, 3rd leaves and internodes (10.75 mg/g). Asparagine shows higher levels in bud (7.70 mg/g), 1st leaf (6.40 mg/g) and in internodes (5 mg/g). Glutamic acid presents higher level in internodes (3.13 mg/g) and methionine in bud (2.93 mg/g) and in 1st leaf (2.68 mg/g). Phenylalanine was higher in internodes (4.13 mg/g) and in the combination of bud, 1st, 2nd, 3rd leaves and internodes (3.39 mg/g). Internodes presents the higher amount of total AA (50.49 mg/g), followed by the combination of bud, 1st, 2nd leaves and internodes (43.78 mg/g), and lowest value in the combination of bud, 1st and 2nd leaves (22.44 mg/g). The results clearly show differences in the AA profile and particularly in the theanine content in various parts of *C. sinensis*, and the internodes were shown to contain the highest theanine levels as compared to the other shoots.

1. INTRODUCTION

Tea (*Camellia sinensis*) is one of the most popular beverages worldwide and preclinical and epidemiological investigations suggest that drinking tea may block the development of various disorders, such as cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases [1]. The predominant amino acid (AA) in *C. sinensis* is L-theanine (5-*N*-ethyl glutamine) that is a non-protein AA and constitutes usually between 0.2 and 2% of the dry weight (DW) accounting for up to 50% of all free AAs. Theanine has a number of biological effects such as: a calming effect on the

mental state by lowering blood pressure; inhibits caffeine's side effects [2,3]; stimulates the release of dopamine, a brain's neurotransmitter responsible for confidence and sense of well-being [4] and stimulates the production of alfa brain waves (an electromagnetic oscillations in the frequency range of 8–13 Hz) creating, consequently, a state of deep relaxation and mental alertness [5]. In addition, theanine is thought to play a major role in preventing neuronal death that is a particularly important finding for the prevention of ischemia and strokes [6]. Furthermore, some recent studies also suggest that theanine may be clinically useful for preventing Parkinson's disease symptoms [7]. Knowing the strong impact of theanine on human health, the objective of this study was the determination by HPLC/DAD of the AA profile, including theanine, in different parts of the Azorean *C. sinensis*, in order to find the best tea blend that leads to the highest benefit for human health.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

Standard L-theanine (lot 606121) used in this study was generously donated by Taiyo Kagaku International Inc. (Boise, ID). Amino acid (AA) standard mixture and *o*-phthaldialdehyde (OPA) were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). β -mercaptoethanol, potassium monobasic phosphate, sodium acetate and sodium phosphate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Acetonitrile, tetrahydrofuran (THF) and methanol, HPLC-grade, were purchased from Riedel-de-Häen (Seelze, Germany) and other chemical and solvents were analytical grade. Deionised water was obtained from an in-house Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. Sample collection, preparation and extraction

Samples of different parts of Azorean *C. sinensis* shoots were provided by Gorreana Tea Plantation (Azores). A 500 mg amount of dried samples, which have been grounded, were steeped at 70 °C for 15 min in 50 mL of distilled water. The extraction was repeated three times and the solution of the combined extracts, after cooling for 10 min, was filtered under vacuum through a 0.45 μ m (pore size) cellulose acetate membrane to remove particulate matter, dried in a vacuum rotatory evaporator at 40 °C and reconstituted with distilled water in a 25 mL volumetric flask. A 50 μ L aliquot of solution was used for analysis by HPLC/DAD after pre-column derivatization as described in Section 2.3. The L-theanine stock solution was prepared at final concentration of 40 μ g/mL.

2.3. Sample derivatization with OPA for HPLC analysis

The OPA reagent was prepared according to the method published by Baptista et al. [2]. The OPA-reagent was kept overnight before use. A 50 μ L of the extracts, standards or control (distilled water), diluted with the same volume of distilled water, were derivatised with 50 μ L of OPA reagent for 4 min. The reaction was stopped by the addition of 100 μ L of 0.4 M

potassium monobasic phosphate (pH 4.0). An aliquot of 10 µL was injected onto the RP-C18 column for analysis.

2.4. HPLC/DAD analysis

The HPLC system consisted of an Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) series 1200 Liquid Chromatograph with diode array detector (DAD). The DAD was fixed at 338 nm. Before the HPLC analysis, the extracts were filtered through a polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane cartridge. An RP-HPLC column, Spherisorb ODS-2 C18 5 µm (150 x 4.6 mm id.) was used with the following eluent system: phase (A) 50 mM sodium acetate plus 50 mM Na₂HPO₄ (pH 7.5):methanol:THF (96:2:2, v/v/v) and phase (B) methanol:water (70:30, v/v), using the following linear gradient elution: t = 0 min – 25% B, t = 10 min – 25% B, t = 30 min – 40% B and t = 40 min – 100% B, with a flow rate of 0.7 mL/min at the column temperature of 35 °C. The chromatograms were recorded according to the retention time, and the AAs were identified by retention time based on comparison with the authentic standard and/or by spiking the sample with standard. The average of three measurements was used to calculate the AAs extracts content and the results were expressed in mg per g of DW.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the AAs profile, including theanine, of different parts of Azorean *C. sinensis*. The results (on a dry weight basis) show that the total AA content range from 22.44 to 50.49 mg/g, presenting the internodes the highest value. The internodes presents also the higher amount of theanine (17 mg/g), followed by the combination of bud, 1st, 2nd leaves and internodes (10.59 mg/g) and bud, 1st, 2nd, 3rd leaves and internodes (8.78 mg/g). The combination of bud, 1st and 2nd leaves present the lower levels of theanine (1.74 mg/g). The histidine is also an AA with higher levels in internodes (13.73 mg/g), followed by the combination of bud, 1st, 2nd, 3rd leaves and internodes (10.75 mg/g) and bud, 1st, 2nd leaves and internodes (10.18 mg/g). The *C. sinensis* also revealed a good amount of asparagine that range from 3.01 to 7.70 mg/g, presenting higher level in bud followed by 1st leaf (6.40 mg/g) and internodes (5 mg/g). Glutamic acid presents higher level in internodes (3.13 mg/g) and methionine in bud (2.93 mg/g) and in 1st leaf (2.68 mg/g). Phenylalanine was higher in internodes (4.13 mg/g) and in the combination of bud, 1st, 2nd, 3rd leaves and internodes (3.39 mg/g).

Table 1. Amino acids profile of different parts of Azorean *Camellia sinensis* shoots (mg amino acids/g dry weight)^a.

| Amino acid (AA) | Bud | 1 st leaf | 2 nd leaf | Bud + 1 st + 2 nd leaves | Bud + 1 st + 2 nd leaves + internodes | Bud + 1 st + 2 nd + 3 rd leaves + internodes | Internodes |
|-----------------|------------|----------------------|----------------------|--|---|---|------------|
| Asp | 0.98±0.02 | 0.88±0.05 | 1.78±0.05 | 1.63±0.04 | 0.78±0.02 | 0.78±0.04 | 0.55±0.08 |
| Glu | 2.10±0.15 | 2.40±0.07 | 2.45±0.05 | 2.28±0.07 | 2.50±0.03 | 2.20±0.02 | 3.13±0.10 |
| Asn | 7.70±0.23 | 6.40±0.10 | 4.06±0.13 | 3.56±0.10 | 4.76±0.11 | 3.01±0.04 | 5.00±0.010 |
| Ser | 1.88±0.11 | 2.50±0.02 | 1.88±0.09 | 1.73±0.03 | 2.01±0.08 | 1.28±0.02 | 1.20±0.04 |
| His | 2.68±0.12 | 3.48±0.14 | 3.98±0.09 | 3.93±0.08 | 10.18±0.11 | 10.75±0.08 | 13.73±0.06 |
| Gly | tr | 0.38±0.03 | 0.45±0.07 | 0.28±0.02 | 0.21±0.02 | 0.93±0.05 | 1.28±0.02 |
| Thr | 0.73±0.08 | 0.80±0.04 | 0.65±0.09 | 0.60±0.07 | 1.07±0.05 | 1.73±0.03 | 1.28±0.01 |
| Arg | 0.95±0.06 | 1.23±0.09 | tr | 0.75±0.09 | 1.68±0.03 | tr | tr |
| Thea | 2.35±0.07 | 2.30±0.07 | 2.73±0.06 | 1.74±0.02 | 10.59±0.09 | 8.78±0.04 | 17.00±0.07 |
| Ala | tr | 0.58±0.08 | 0.60±0.07 | tr | 0.25±0.01 | 0.45±0.02 | tr |
| Tyr | 0.45±0.06 | 0.53±0.08 | 0.55±0.07 | 0.50±0.03 | 1.20±0.04 | 0.83±0.02 | tr |
| Met | 2.93±0.011 | 2.68±0.08 | 1.75±0.09 | 1.65±0.07 | 2.50±0.03 | 1.55±0.05 | 1.58±0.04 |
| Trp | nd | nd | 2.30±0.03 | nd | nd | nd | nd |
| Phe | 2.50±0.08 | 2.33±0.02 | 1.60±0.04 | 1.43±0.05 | 3.39±0.09 | 1.95±0.06 | 4.13±0.07 |
| Ile | 2.30±0.08 | 1.90±0.03 | 1.15±0.04 | 1.18±0.02 | 1.27±0.07 | 1.00±0.07 | 0.83±0.02 |
| Leu | 1.95±0.06 | 1.93±0.02 | 1.17±0.02 | 1.18±0.04 | 1.39±0.07 | 1.03±0.06 | 0.78±0.03 |
| Total AA | 29.50 | 30.32 | 27.10 | 22.44 | 43.78 | 36.27 | 50.49 |

^a Values are mean ± SD (*n* = 3). Thea, theanine. nd, not detected. tr, traces.

4. CONCLUSION

In summary, an effective method to determine the AAs profile, including L-theanine, in different parts of *C. sinensis* has been successfully developed by using HPLC-DAD. The results revealed that different parts of *C. sinensis* presented different amounts of common AAs and theanine. In general, the different parts are a good source of AAs, particularly, theanine, histidine, asparagine, glutamic acid, methionine and phenylalanine. This study also revealed that the internodes are important to maximize the levels of theanine. However, future research are need to establish the association of different parts of tea plants with temperatures and time of drying on the effects of theanine content in order to produce tea with highest benefits for human health.

References

- [1] SM Chacko, PT Thambi, R Kuttan, I Nishigaki, Chin Med, 2010, 5, 13.
- [2] J Baptista, E Lima, A Andrade, M Alves, L Paiva, Food Chem, 2012, 132, 2181–2187.
- [3] JC Too, T Kinyanjui, JK Wanyoko, FN Wachira, Food Nutr Sci, 2015, 6, 1014–1021.
- [4] H Yokogoshi, M Kobayashi, M Mochizuki, T Terashima, Neurochem Res, 1998, 23, 667–673.
- [5] K Kobayashi, Y Nagato, N Aoi, LR Juneja, M Kim, T Yamamoto, et al, Nippon Nogeikagaku Kaishi, 1998, 72, 153–157.
- [6] T Kakuda, H Yanase, K Utsunomiya, A Nozawa, T Unno, K Kataoka, Neurosci Lett, 2000, 289, 189–192.
- [7] H-S Cho, S Kim, S-Y Lee, JA Park, S-J Kim, HS Chun, Neurotoxicology, 2008, 29, 656–662.

Colagens emergentes: influência na composição fenólica e características organoléticas dos vinhos

Telmo Francisco^{a}, Rosa Pérez-Gregorio^a, Susana Soares^a, Adriana Xavier^b, Manuel Figueiredo^b, João Simões^c, Nuno Mateus^a, Filipe Centeno^b, Maria de Fátima Teixeira^b, Victor de Freitas^a*

^aLAQV-REQUINTE, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, Portugal;

^bPROENOL, Indústria Biotecnológica, Lda, VNG 4405-194 Portugal;

^cBIOCANT – Centro de Inovação em Biotecnologia, BIOCANT PARK – Parque Tecnológico de Cantanhede, Núcleo 04, Lote 3, 3060-197 Cantanhede, Portugal.

*tel@fc.up.pt

Palavras chave: vinho; clarificação; amargor; adstringência

RESUMO

Os polifenóis desempenham um papel preponderante na indústria enológica, sobretudo ao nível das características organoléticas. No setor vinícola a qualidade é um conceito basilar face às exigências do consumidor [1]. O vinho possui partículas capazes de formar uma turvação que estraga a aparência do mesmo assim como pode afetar o seu sabor. O objetivo da clarificação é eliminar estas partículas estabilizando o vinho de modo a garantir clareza a longo prazo e evitar depósitos. A clarificação pode ser induzida por um processo de colagem, que depende da adição de colas, geralmente de origem animal, que induzem a floculação [2]. A este tipo de colas tem sido associada a incidência de alergias alimentares, surgindo a necessidade de criar novos produtos. Sendo assim, foi colocada a hipótese de utilizar extratos proteicos de leveduras (EPL's) como colas enológicas que apresentem um poder clarificante e estabilizante igual ou superior ao das colas comerciais, sendo ainda capazes de potenciar as propriedades organoléticas dos vinhos [3].

Este trabalho tem como objetivo avaliar a influência dos EPL's na composição fenólica e na cor dos vinhos. Através de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS) foi possível identificar quais os compostos fenólicos presentes no vinho. A análise foi direcionada para os compostos fenólicos que foram previamente relacionados com a perceção de amargor e adstringência. Observou-se que, de forma global, ocorreu uma diminuição significativa da maioria destes compostos. Através do estudo da cor pelo sistema CIELab verificou-se que os EPL's aplicados nos vinhos têm a capacidade em reduzir os tons amarelos dos vinhos colados com os extratos, demonstrando um poder clarificante notório. Conclui-se que os EPL's apresentam um enorme potencial como alternativa às colas comerciais atualmente disponíveis no mercado.

1. INTRODUÇÃO

Os polifenóis têm um papel fundamental na indústria do vinho, desempenhando um papel crucial nas características organoléticas dos vinhos, nomeadamente na cor, aroma e sabor. As

classes de polifenóis mais importantes na química dos vinhos são as antocianinas (pigmentos vermelhos) e os 3-flavanóis (taninos) [4]. Algumas partículas em suspensão presentes no vinho são capazes de formar uma turvação que afeta não só a sua aparência como também o seu sabor. Esta turvação pode ser removida através de uma clarificação, processo que ocorre através de vários fenômenos físicos e químicos que promovem a precipitação de alguns dos polifenóis do vinho mais reativos ou instáveis. O objetivo da clarificação é eliminar estas partículas estabilizando o vinho de modo a garantir clareza a longo prazo evitando depósitos. A clarificação pode ser induzida pela adição de colas enológicas geralmente de origem animal com capacidade para promover a floculação. As colas de origem animal, nomeadamente a caseína, a gelatina, a β -lactoglobulina e a ovoalbumina, atualmente são as mais utilizadas na indústria, contudo foi associada a incidência de alergias alimentares a este tipo de colas, surgindo assim a necessidade de desenvolver novos produtos [2, 5, 6]. Sendo assim, foi colocada a hipótese de utilizar extratos proteicos de leveduras (EPL's) como alternativa às colas enológicas tradicionalmente utilizadas, dado que as leveduras em causa são endógenas do vinho, garantindo-se a isenção de potenciais agentes alergénicos. Pretende-se ainda que este produto apresente um poder clarificante e estabilizante igual ou superior ao das colas comerciais assim como se espera que também seja capaz de potenciar as propriedades organoléticas dos vinhos [3]. A técnica de LC-MS/MS permite identificar os compostos fenólicos que se relacionam diretamente com o amargor e a adstringência. O sistema CIELab permite avaliar e quantificar a cor dos vinhos baseando-se na teoria de percepção de cores opostas estabelecendo-se um espaço constituído por três coordenadas L^* , a^* e b^* , que indicam respetivamente a luminosidade, os tons de vermelho(a^*)/verde(- a^*), e os tons amarelo(b^*)/azul(- b^*) [7]. Este trabalho tem como objetivo avaliar de que modo é que os EPL's interferem quer na composição fenólica dos vinhos assim como na cor e na qualidade organolética dos mesmos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras

Foram efetuados dois ensaios de colagem. O ensaio 1 foi realizado com vinho branco proveniente da região do Ribatejo e o ensaio 2 com um proveniente da região da Bairrada.

2.2. Ensaios de colagem

O primeiro ensaio consistiu na aplicação de EPL's em diferentes dosagens, nomeadamente 30 e 50 g/hL, assim como de diferente tipo (A e B), com o intuito de definir qual o melhor tratamento a aplicar. Após ter-se verificado qual o tratamento que evidenciava melhores resultados procedeu-se a um segundo ensaio no qual apenas foi aplicada uma única dosagem, 30 g/hL, com o objetivo de verificar qual o efeito do processo de obtenção do EPL. Os EPL's foram desenvolvidos e aplicados nos vinhos pela Proenol, Indústria Biotecnológica.

2.3 Extração de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos do vinho foram extraídos através de uma extração líquido-líquido. Cerca de 50 mL de vinho foram extraídos com 3 x 20 mL de acetato de etilo. De seguida a fase orgânica foi evaporada à secura e ressuspensa em 1 mL metanol:água (50:50) de modo a ser analisada por LC-MS/MS.

2.4 Análise LC-MS/MS

Os compostos fenólicos foram analisados num HPLC *Finnigan Surveyor* acoplado a um detetor de massa de trampa iónica *Finnigan LQC DECA XP MAX* (Finnigan Corp., San José, Calif., USA) com uma fonte de ionização API (*Atmospheric Pressure Ionization*) e uma interface ESI (*ElectroSpray Ionization*). 20 µL de amostra foram injetados numa coluna LicroCART® C18 (150 x 4,6 mm d.i., 5 µm) termostaticada a 25 °C a um fluxo de 0.3 mL min⁻¹. A: H₂O/CH₃COOH (99:1, v/v), e B: H₂O/CH₃CN/CH₃COOH (70:29:1, v/v/v) foram as fases móveis usadas na eluição usando um gradiente de 20 a 80% B em 55 min, mudando a 90% B em 15 min e atingindo 100% B aos 90 min. Os analitos foram monitorizados a 280 nm na deteção UV. Da mesma forma, foi aplicada uma voltagem do capilar de 4V, à temperatura de 325 °C para a formação do ESI. Foi selecionada uma energia de colisão de 45 (CID) no processo de identificação por HPLC-MS/MS. A deteção foi obtida em modo negativo de 120 m/z a 2000 m/z.

2.4 Estudo CieLab

Para a determinação das coordenadas do espaço CIELab procedeu-se à determinação do espectro de transmitância dos vinhos para o espectro visível de luz (360-830 nm). As leituras foram efetuadas num espectrofotómetro UV-Visível Thermo Scientific Evolution Array. Cada ensaio foi realizado em triplicado e a leitura da transmitância foi feita, em relação à água desionizada, em células de vidro de 2 mm de percurso ótico. Posteriormente, de modo a determinar os valores triestimulares (X, Y e Z) e as respetivas coordenadas L* a* b* para cada vinho, foi utilizado um software desenvolvido pelo Departamento de Física da Universidade do Porto. A determinação dos valores ocorreu com a condição iluminante D65 e um ângulo do observador de 10°.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise por LC-MS/MS foi possível identificar os compostos previamente identificados como adstringentes, nomeadamente o ácido ferúlico, o ácido caftarico, a isorhamnetina-3-o-glucósico e a dihidroquercetina-3-o-glucósido, assim como foram também identificados compostos relacionados com o amargor, como o cafetato de etilo, ferulato de etilo, galato de etilo, siringato de etilo, galato de metilo, catequina, epicatequina, assim como as procianidinas B1, B2, C1 e C2 [8]. Verificou-se de forma global que todos os tratamentos contribuíram para a diminuição da quantidade tanto de compostos amargos como adstringentes, contudo o EPL A aplicado na dosagem de 30 g/hL foi o que melhores resultados evidenciou

diminuindo em cerca de 35% os compostos amargos e 27% os adstringentes. O estudo da cor através do sistema CIELab permitiu verificar que todos os tratamentos aplicados demonstraram capacidade em reduzir a intensidade da cor amarela dos vinhos. No segundo ensaio foram ainda identificados mais dois compostos amargos, o ácido gálico e o cumárico, assim como também foi identificado o cinemato de etilo, de caráter adstringente. Identificou-se um novo composto, o GRP, que está diretamente relacionado com a oxidação. Verificou-se novamente que os dois tratamentos aplicados tiveram a capacidade em diminuir a quantidade de compostos amargos e adstringentes, contudo o EPL que se destacou foi o de banda larga. À semelhança do primeiro ensaio foi também efetuado o estudo da cor, a partir do qual se verifica que ambos os tratamentos tiveram a capacidade de reduzir a intensidade da cor amarela, sendo mais evidente no caso do EPL B. É de salientar que os resultados analíticos obtidos estão de acordo com a análise sensorial efetuada na Proenol.

4. CONCLUSÕES

Sob o ponto de vista enológico concluímos que os EPL's apresentam um enorme potencial enquanto alternativa às colas comerciais, verificando-se que potenciam as características organoléticas dos vinhos reduzindo o caráter amargo e adstringente dos vinhos. Os EPL's contribuem também para uma redução notória dos tons amarelos, sendo esta uma característica crucial intrínseca ao consumidor final, que cada vez mais procura produtos que se distinguem pela qualidade.

Agradecimentos

Projeto BioClarVino II (POCI-01-0247-FEDER-017687) e LAQV (UID/QUI/50006/2013POCI/01/0145/FEDER/007265) da FCT/MEC financiado através de fundos nacionais e cofinanciado pelo FEDER, nos termos do acordo de parceria PT2020.

Referências

- [1] Finning Agents, The Australian Wine Research Institute webpage
- [2] Granato, T.M., Nasi, A., Ferranti, P. et al, Eur Food Res Technol, 2014, 238- 265.
- [3] Leticia Martínez-Lapuente et al, Food Research International 2017, 235-243.
- [4] Mateus, N., Revista Real Academia Galega de Ciencias, 2009, 28, 5-22.
- [5] Y. El Rayess et al, Journal of Membrane Science, 2011, 382, 1-19.
- [6] Granato, T.M., Nasi, A., Ferranti, P. et al, Eur Food Res Technol, 2014, 238- 265.
- [7] Bakker, J., Bridle, P., Timberlake C. F., Vitis, 1986, 25, 67-78.
- [8] Hufnagel, Hofmann, J. Agric. Food Chem., 2008, 56, 19, 9195.

Novos potenciais para os produtos secundários da produção

Adding Value to Agrifood By-Products as Therapeutic Alternatives: A Case Study of Herbal Medicine Research

Thelma B. Machado^{1,2}, Maria Beatriz P. P. Oliveira²

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Rua Dr. Mário Viana, 523, Santa Rosa, Niterói, RJ, Brasil.

² Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, Porto, Portugal.
thel34@gmail.com

1. INTRODUCTION

Traditionally, most crops have been focused on obtaining a single high-value product, discarding the remaining parts of the plant or fruit, or exploiting them to obtain low value products [1]. Many of these materials are rich in polyphenols, which are known for their ability to precipitate proteins, one of the supportive clues for their wound healing properties [2]. Due to the high rates of recurrence of chronic wounds, new effective therapeutic strategies need to be developed. Plants represent important sources of alternative formulations that will complement the skin therapy arsenal in either prevention or treatment.

Punica granatum L. (Punicaceae), commonly known as pomegranate, is a shrub or a small tree native to the Mediterranean region. The different parts of pomegranate have been known as a reservoir of bioactive compounds with potential biological activities [3]. This species is rich in phenolic compounds and is an important source of hydrolysable tannins, ellagitannins and ellagic acid [4]. Pomegranate is also used for functional food ingredient in various forms, such as juice, jelly, and alcoholic beverages produced with fresh seeds, as well as spices prepared from dried seeds [5]. Pharmacological activities of many pomegranate components suggest a wide range of applications for the prevention and relief of disease symptoms where chronic inflammation is believed to play an essential etiologic role.

Following the premise that agrifood by-products are not residues but raw materials for new products and as part of our effort to identify the responsible substances for the pharmacological activities attributed to plants utilized in traditional medicine, we have studied the pericarp (peel) of pomegranate fruits in order to identify the components with antimicrobial activity [6]. In this study we have identified the ellagitannin punicalagin as the biological marker of *P. granatum* extracts, which were active against multi-resistant bacterial strains. Despite the promise of *P. granatum* extracts as a therapeutically active ingredient for many applications, there is little data available concerning the standardization and stability of extracts that would potentially be suitable for the development of an appropriate topical preparation for use in clinical trials. In order to find a suitable biomarker to establish quality control parameters of *P. granatum* peel extracts and upon consideration of its physiochemical properties and stability, a hydrogel-based formulation was developed and evaluated.

Case Presentation

A 76-year-old woman presented with the chief complaint of a non-healing ulcer on the left leg, with pain and swelling. The ulcer had not responded to consistent conventional

treatment for more than one year. The patient was a non-smoker and non-drinker. There was no history of trauma, varicose veins, or calf pain, but a history of vascular disease. Physical examination revealed a single shallow, irregular, large, almost rectangular shaped, about 6.8×4.3 cm ulcer on her lower left leg. The surface of the ulcer demonstrated shiny granulation tissue (Figure 1a). There were mild eczematous changes of the surrounding skin. There was a purulent foul smelling moderate amount of discharge from the wound, with surrounding edema. The patient reported pain at the affected area while walking and was referred to the angiology service for wound management. Despite rigorous medical measures in the form of frequent use of anabolic and topical antimicrobial agents (clostebol, neomycin, gentamicin and silver sulphadiazine), topical corticosteroids (betamethasone dipropionate), debridement, and dressing for the ulcer, the subject had a recurrent chronic wound on the left leg with an area measuring 23.52 cm^2 . The ulcer was in stage II, with not well-defined wound margins. The angiologist prescribed a magistral formulation of a 2% (w/w) *P. granatum* peel ethanolic extract based on a hydrophilic cream and zinc oxide. The formulation was applied to the ulcer once a day and the physician's application was taken with the written informed consent of the patient. Oral iron therapy, diuretics and other supplementary treatment were initiated. Tramadol was prescribed as pain reliever and no antibiotics were given during this course of treatment. After application, the ulcer was dressed with cotton gauge. Within six weeks, the ulcer had decreased to one quarter of its original size and had completely healed six weeks later (Figure 1b–d). A total of 90 applications were needed for complete healing. No adverse effects of the formulation were observed.

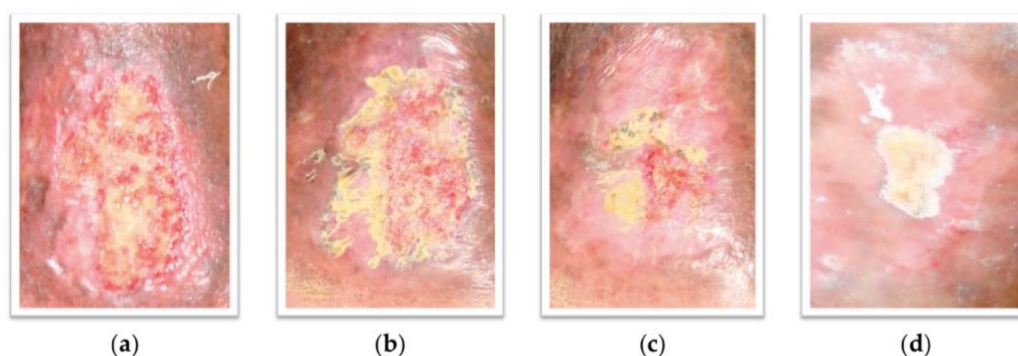


Figure 1: Photographs of the patient's wound. PGMF: *Punica granatum* magistral formulation; (a): 1 day before PGMF treatment; (b): week 1 of PGMF treatment; (c): week 6 of PGMF treatment; (d): week 10 of PGMF treatment.

2. MATERIAL AND METHODS

For the extraction optimization of the ellagitannins, we have used extractions assisted by microwave, which furnished higher content levels of this substance in comparison with static extraction techniques. The microwave-assisted extractions were performed in Anton Paar reactor, model Monowave 300 (Graz, Austria). Punicalin and punicalagin standards were obtained from Biopurify Pharmaceuticals Ltd. (Chengdu, China), purity over 98%. HPLC-grade solvents and all other chemicals used in this study were obtained from Merck Chemical Company (Darmstadt, Germany). Fruits of *P. granatum* L. were collected in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Peels were separated and dried in an oven with forced air

circulation at 37 °C (Model 411D, Nova Ética, São Paulo, Brazil) and pulverized by a mechanical grinder. A voucher specimen (RFA No. 30906) was deposited in the *herbarium* of the Department of Botany at Rio de Janeiro Federal University. The extracts were filtered and concentrated using vacuum rotatory evaporation (85-01 LABTEC LB, São Paulo, Brazil) at 40 °C. The dried extracts ($21.7 \pm 0.76\%$, ethanol free) obtained were used in a 2% (w/w) hydrogel-based formulation using carbomer 980 (1%), imidazolidinyl urea (0.5%), methylparaben (0.15%), aminomethylpropane (1%) and distilled water up to 100 g. The formulation was packaged in polyethylene tubes and stored both in a climatic chamber at $40 \pm 2^\circ\text{C}$ / $75 \pm 5\%$ RH and in a temperature test chamber at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ / ambient humidity (Nova Ética). Samples were evaluated in triplicate at 0 (T0), 3 (T3) and 6 (T6) months and the procedures were performed in accordance with the stability test of international pharmaceuticals guideline [7]. Sensorial features of the samples were examined at the same temperature, lighting and packaging conditions to assess variations in appearance, phase separation, color and odor.

2.1 HPLC-DAD Analysis

Extractions of hydrogel samples (0.75 mg) were carried out with methanol (50 mL) using volumetric flasks with the aid of an ultrasonic bath for 40 min. The methanol extracts were filtered and concentrated using vacuum rotatory evaporation at 40°C. Methanol-free extracts were solubilized in distilled water, frozen at -10°C and lyophilized (Liotop L108, Liobras, São Carlos, Brazil). Freeze-dried samples were prepared to a concentration of 1 mg/mL, with injection volume of 10 μL . Before injection, the samples were filtered through a 0.45 μm nylon membrane filter (Millipore, Billerica, MA, USA), and submitted to HPLC-DAD analysis. The apparatus used in the study consisted of a Shimadzu controller (CBM-20A); solvent pump unit (LC-20AT) and a Diode Array Detector (SPD-M20A) (all Shimadzu). UV spectra set at 254nm were recorded for peak characterization. Separation was performed with a C18 column (Dr. Maisch GmbH; 5 μm , 250 mm \times 4.6 mm; 25°C). Mobile phase consisted of an isocratic system (A) 0.1% (v/v) aqueous solution of phosphoric acid and (B) acetonitrile (80:20); flow rate of 1 mL/min. Punicalin and punicalagin analytical reference solutions were prepared by serial dilutions from methanol mother standard solutions of 1 mg/mL. The analytical curves were established using externally prepared standards, and five points from the standards solutions in methanol at concentrations of 0.5; 0.25; 0.125; 0.0625 and 0.0362 mg/mL, prepared on the same day on which the analyzes were performed [8]. All analyzes were performed in triplicate.

2.2 Statistical Analysis

Results are presented as mean \pm standard error of mean (SEM) and statistical significance between groups was determined by two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey-test *post hoc* analysis and Bonferroni (test of sphericity) for comparison of differences between data sets. *p*-Values less than 0.05 were considered to be significant.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The results showed that during three months of storage there was no significant difference of punicalagin content in the hydrogel formulation when the product was stored in a temperature test chamber or in a climatic chamber. There was a significant reduction of 12.4% in punicalin content when the product was stored in a climatic chamber (T3)

compared with the product stored in a temperature test chamber. This reduction in punicalin content was also observed after six months (T6) in the product stored in a climatic chamber, showing a reduction of 38.7% compared to T3. Punicalagin content in the ionic hydrogel formulation showed no statistical difference between time and storage conditions ($p > 0.05$), showing that punicalagin has greater stability compared to punicalin.

In daily care related to the treatment of wounds there is a great concern about the techniques used for the removal of bandages and medicines applied to the lesion and, consequently, its sanitation. This process can be very painful for the patient, which means that special attention is necessarily given in the development of formulations exhibiting characteristics that make this process easier, minimizing patient discomfort and allowing the ready examination of the lesions [9]. The hydrogel-based formulation evaluated was found to give the optimal spreadability, acceptable color appearance, tactile feel, uniform texture and low-odor. No significant results for microbiological analysis were found during the stability study. The microbiological analysis evaluation showed the efficiency of manipulation techniques and microbiological preservatives to keep the formulation characteristics and prevent growth of microorganisms.

The ellagitannins punicalin and punicalagin were identified as the major chemical constituents of purified active fractions of peel extracts of *Punica granatum* [6]. The evaluation of the antimicrobial activity of isolated punicalagin against multiresistant hospital staphylococcal strains showed that this ellagitannin is the biomarker responsible for the inhibitory activity, showing the same Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of active fractions (62.5 µg/mL) [6]. In the present investigation, a 2% (w/w) ethanolic extract ionic hydrogel formulation showed an average punicalagin content of 17.9 mg. Under more drastic storage conditions (climate chamber, 40 °C/75% RH), the average content of punicalagin reached 11.2 mg (37.4% reduction). However, the proposal of a formulation of 2% (w/w) was due to the fact that in a previous study a 1% (w/w) product had already been proposed, since the fractions enriched with ellagitannins isolated from hydroalcoholic extracts of *P. granatum* peels had the same MIC of micronized silver sulfadiazine (62.5 µg/mL) over the same multi-resistant bacteria [10]. Moreover, the results obtained in the case study were related to a 2% (w/w) formulation of a hydroalcoholic extract of *P. granatum* peels. Silver sulfadiazine is a drug of choice for treating difficult to treat burns and wounds, both for its healing action and for its antimicrobial activity. Silver sulfadiazine products are usually prescribed as 1% (w/w) creams or ointments to 1%. The formulation evaluated in the present study has a double concentration of the product previously proposed, ensuring a longer shelf life for the product standardized with punicalagin as its biomarker. Further studies to determine the shelf life of the hydrogel-based formulation, long-term studies (24 months), and toxicological studies are necessary to be performed, so that the product will have guaranteed effectiveness and safety.

4. CONCLUSION

For the extraction optimization of ellagitannins, we have used extractions assisted by microwave, which furnished higher content levels of this substance in comparison with static extraction techniques. The extracts of *P. granatum* peel were then used to produce a topical phytomedicine formulation prescribed for the treatment of infected chronic vascular ulcers of a patient who was not responsive to conventional treatment with antimicrobials and *corticosteroids for, at least, one year*.

The hydrogel-based formulation was standardized and subjected to physicochemical studies to establish the quality control parameters. The stability and quantitative chromatographic data were assessed, and an efficient HPLC-DAD method was established

distinguishing the biomarkers punicalin and punicalagin simultaneously in a single 8 min run.

The complete closure of the wounds was observed after three months *treatment exclusively with a 2% (w/w) P. granatum* formulation.

The formulation presented suitable sensorial and physicochemical performance, showing that punicalagin was not significantly affected by storage ($p > 0.05$). Formulations containing extracts with not less than 0.49% (w/w) total punicalagin might find good use in wound healing therapy.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank the financial support to the project Operação NORTE-01-0145-FEDER-000011– called Food Quality and Safety - a (nano) technological approach. This work was also supported by the project UID/QUI/50006/2013 – POCI/01/0145/FEDER/ 007265 with financial support from FCT/MEC through national funds and co-financed by FEDER.

6. REFERENCES

- [1] Peralbo-Molina, A. and Castro, M. D. L. *Trends Food Sci Tech* **2013**, 32, 16-24.
- [2] Murthy, K.N.C., *et al.*, *J. Med. Food* **2004**, 7, 256–259.
- [3] Bekir, J.; Mars, M.; Souchard, J.P.; Bouajila, J. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, 55, 470–475.
- [4] Singh, K., *et al.* *Phytother. Res.* **2009**, 23, 1565–1574.
- [5] Sheng, W. and Tian, L. *Molecules* **2017**, 22, 1606.
- [6] Machado, T.B., *et al.* *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, 13, 606–610.
- [7] The International Conference on Harmonisation ICH Q1A (R2) Available online: (accessed on 16 September 2018).
- [8] Fleck, A., *et al.* *Molecules*. **2016**, 21, 1059, 1-13.
- [9] Staubach, P. and Metz, M. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **2013**, 11, 1049–1055.
- [10] Machado, T.B. *Ph.D. Thesis*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 15 May 2003.

Obtenção de um concentrado de cafeína a partir da pele de prata do café

Rita C. Alves^{a}, Hélder Puga^b, Anabela Costa^a, Sílvia Bessada^a, M. Beatriz P.P. Oliveira^a*

^a REQUIMTE/LAQV, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, Portugal

^b CMEMS-UMinho, Guimarães, Portugal

* rcalves@ff.up.pt

Palavras chave: cafeína; pele de prata; café; extração; HPLC-DAD

RESUMO

A pele de prata é o principal subproduto da torrefação do café. Há estudos que sugerem a sua potencial utilização como fonte de nutrientes e compostos bioativos devido à sua riqueza em fibra, compostos fenólicos e cafeína. O objetivo deste trabalho consistiu na obtenção de um pó rico em cafeína, preparado a partir da pele de prata do café, um subproduto da torrefação do grão. Para isso, utilizou-se um método de ultrassons baseado numa tecnologia de Multifrequência, Multimodo, Modelada (MMM). O dispositivo de ultrassons foi otimizado especificamente para aumentar o desempenho da extração em meio líquido, considerando a influência das condições na resposta dinâmica do transdutor. O tempo de tratamento, a amplitude de vibração, a temperatura alcançada e a necessidade de moagem prévia foram as variáveis estudadas. Os resultados foram comparados com uma extração sólido-líquido convencional, previamente otimizada para o efeito. A extração por ultrassons permitiu obter uma maior recuperação da cafeína (+23%), sem qualquer necessidade de preparação prévia da amostra e utilizando apenas água como solvente de extração. Após liofilização, obteve-se um pó concentrado com um teor de cafeína aproximadamente 10 vezes superior ao da matriz original, passível de ser utilizado para outros fins.

Estes resultados mostram que este tipo de processo de extração, baseado na tecnologia dos ultrassons, pode ser de grande interesse para recuperar compostos bioativos a partir de matrizes naturais, de uma forma eficiente e limpa.

1. INTRODUÇÃO

Hoje em dia, a sustentabilidade dos processos e a valorização dos subprodutos agroalimentares é uma prioridade por parte de entidades nacionais e europeias.

A pele de prata é o principal subproduto da indústria de torrefação do café. Consiste numa fina película que reveste a camada exterior dos grãos verdes e se destaca quando estes são sujeitos ao processamento térmico. Na maioria das vezes, este produto é descartado e utilizado para compostagem e adubação de terrenos ou, ainda, como combustível, por queima direta.

O uso da pele de prata do café como ingrediente funcional tem sido sugerido por alguns autores, com base no elevado teor em fibra solúvel (~ 60%) e atividade antioxidante [1,2]. A cafeína, essencialmente presente nos grãos de café, é uma metilxantina amplamente conhecida

pelo seu efeito estimulante no sistema nervoso central e propriedades antioxidantes. Estudos prévios mostraram que também está presente na pele de prata [2].

Neste trabalho, pretendeu-se otimizar a recuperação de cafeína a partir deste subproduto, comparando dois processos diferentes de extração: por um lado, um método sólido-líquido convencional, previamente otimizado para maximizar a extração de antioxidantes da pele de prata [2]; por outro, através da utilização de um processo físico baseado em energia acústica, no qual se testaram diferentes amplitudes de vibração e tempos de extração, assim como a necessidade de moagem prévia da amostra. O dispositivo de ultrassons utilizado é baseado numa tecnologia MMM, que através de um processamento avançado de sinal é capaz de sincronizar diferentes modos de vibração, promovendo uma distribuição de energia acústica uniforme e homogênea, de elevada intensidade, contribuindo para uma otimização da extração dos compostos químicos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras

A pele de prata utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pela empresa Bicafé - Torrefação e Comércio de Café Lda., Portugal. A amostra resultou da torrefação de uma mistura de café comercial composta por ~ 40% de café arábica (*Coffea arabica*) e ~ 60% de café robusta (*Coffea canephora*). Parte da pele de prata foi moída (GrindomixFig, GM 200, Retsch, Haan, Alemanha) e homogeneizada. Alíquotas moídas e inteiras foram utilizadas para preparar os extratos, como descrito na Tabela 1.

2.2. Preparação dos extratos

2.2.1. Extração sólido-líquido convencional

Efetuiu-se uma extração sólido-líquido clássica, previamente otimizada para extrair compostos antioxidantes da pele de prata do café [2]. Resumidamente, extraiu-se uma quantidade rigorosa (~ 1,00 g) de amostra com 50,00 ml de mistura hidroalcoólica (1:1) sob agitação constante (600 rpm) a 40°C, durante 60 min (E5CC, Omron Corporation, Quioto, Japão). Os extratos finais foram filtrados e armazenados a -25°C.

2.2.2. Extração por via física – energia acústica

De entre os fenómenos físicos associados à propagação de ondas acústicas em líquidos, a cavitação, ou formação de cavidades no seio do líquido, é o mais relevante para o processo de extração. Por outro lado, um determinado meio passível de vibração apresenta um conjunto de modos de vibração, que devem ser acústica e/ou mecanicamente acoplados. Assim, a utilização da tecnologia MMM (Multifrequência, Multimodo, Modulada), através de um processamento avançado de sinal, pode sincronizar muitos desses modos de vibração,

promovendo uma distribuição de energia acústica uniforme e homogênea de elevada intensidade.

O sistema de ultrassons usado consiste num gerador de ultrassons (baseado na tecnologia MMM), um transdutor acústico com frequência média de saída de 20 kHz, um percussor de ondas e um radiador acústico otimizado para o efeito. O dispositivo de ultrassons foi otimizado especificamente para aumentar o desempenho da extração em meio líquido, considerando a influência das condições na resposta dinâmica do transdutor. Tempo de tratamento (extração), amplitude de vibração (25 e 50% da capacidade do transdutor), temperatura variável função do nível de amplitude de vibração aplicada, e a necessidade de preparação da amostra (moagem) foram as variáveis de estudo.

2.3. Análise cromatográfica

A análise cromatográfica foi realizada num sistema HPLC integrado (Jasco, Japão), equipado com um injetor automatizado (AS-950), duas bombas PU-2080 e um detetor de díodos (MD-2010). Os compostos foram separados utilizando uma coluna Tracer Excel ODSA (5 μ m; 250 x 4 mm) da Teknokroma (Barcelona, Espanha). Utilizou-se um sistema de gradiente com dois eluentes: A) ácido acético 0,2% e B) metanol. A cafeína foi monitorizada a 274 nm. A identificação foi feita com base na comparação do tempo de retenção, coeluição com um padrão e por análise do espectro UV (Borwin-PDA Controller Software, JMBS Developments, Le Fontanil, França).

2.4. Análise estatística

Os extratos foram preparados em triplicado e cada extrato foi analisado em triplicado. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, para $n=9$. As diferenças estatísticas encontradas entre os resultados obtidos para cada condição de extração foram representadas por letras diferentes, com base na análise de variância a um fator (ANOVA), seguida do teste de Tukey ($\alpha=0,05$) (IBM SPSS Statistics 23.0, IBM Corporation, Armonk, NY, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 apresentam-se os teores de cafeína obtidos, usando as diferentes condições de extração. No que respeita ao processo com recurso à energia acústica (extração física), para a frequência de ressonância de $19,8 \pm 0,025$ kHz, foram testadas duas amplitudes (25 e 50%) e diferentes tempos de extração. Com as alíquotas moídas, obtiveram-se extratos com teores de cafeína que variaram entre 144 e 211 μ g/ml. Menores tempos de extração mostraram-se menos eficazes para ambas as amplitudes testadas. No entanto, não se encontraram diferenças significativas ($p>0,05$) entre as duas amplitudes para tempos de extração iguais ou superiores a 180 segundos.

Tabela 1. Influência das condições de extração na concentração de cafeína dos extratos.

| Amostra | | Extração por via física | | | | Cafeína |
|--|---------|-------------------------|---------------|-----------|-----------------------------|----------------------------|
| Moída | Inteira | Frequência (kHz) | Amplitude (%) | Tempo (s) | Temperatura atingida (°C)** | µg/ ml de extrato |
| x | | | | 60 | ≈ 25 | 144,5 ± 11,4 ^d |
| x | | 19,8±0,025 | 25 | 180 | ≈ 35 | 204,2 ± 11,2 ^{bc} |
| x | | | | 300 | ≈ 50 | 209,2 ± 17,5 ^{bc} |
| x | | | | 60 | ≈ 30 | 189,6 ± 9,1 ^c |
| x | | 19,8±0,025 | 50 | 180 | ≈ 60 | 207,7 ± 1,1 ^{bc} |
| x | | | | 300 | ≈ 75 | 211,2 ± 13,0 ^{bc} |
| | x | | | 300 | ≈ 75 | 199,5 ± 22,1 ^{bc} |
| | x | 19,8±0,025 | 50 | 420 | ≈ 80 | 235,8 ± 14,1 ^{ab} |
| | x | | | 600 | ≈ 85 | 270,0 ± 23,7 ^a |
| Extração sólido-líquido clássica (otimizada) | | | | | 40 | 219,6 ± 6,8 ^{bc} |
| x | | | | | | |

Média ± desvio-padrão (valores resultantes da análise em triplicado de 3 extratos preparados individualmente); para cada condição de extração: $n=9$. ** Temperatura inicial da mistura – ≈ 20 °C

Relativamente aos diferentes tempos de extração para os ensaios com amplitudes de vibração de 50%, pode-se observar um aumento significativo da eficácia de extração da cafeína com o tempo, inclusive sem moagem prévia da amostra. Em apenas 10 minutos, a extração com recurso a um processamento físico permitiu uma maior recuperação da cafeína (+ 23%), comparativamente com a extração clássica, sem qualquer necessidade de preparação da amostra e utilizando apenas água como solvente de extração. Após liofilização, obteve-se um pó concentrado com um teor de cafeína aproximadamente 10 vezes superior ao da matriz original, passível de ser utilizado para outros fins (ex: aplicações nas áreas alimentar e cosmética).

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro ao projeto Operação NORTE-01-0145-FEDER-000011 - Qualidade e Segurança Alimentar - uma abordagem (nano)tecnológica. Este trabalho foi, ainda, financiado pelo projeto UID/QUI/50006/2013 - POCI/01/0145/FEDER/007265, apoiado financeiramente pela FCT/MEC através de fundos nacionais e cofinanciado pelo FEDER e pelo projeto 033351 – POCI/01/0247/FEDER/033351 (financiado pelo FEDER). S. Bessada agradece à FCT a concessão de uma bolsa de doutoramento (SFRH/BD/122754/2016). Os autores agradecem à BICAFÉ a cedência das amostras.

Referências

- [1] ASG Costa, RC Alves, AF Vinha, E Costa, C Costa, MA Nunes, AA Almeida, A Santos-Silva, MBPP Oliveira, Food Chem, 2018, 267, 28-35.
- [2] SMF Bessada, RC Alves, ASG Costa, MA Nunes, MBPP Oliveira, Sci Total Environ, 2018, 645, 1021–1028.

Sementes de Melão: Potencial como Ingrediente Alimentar

Mafalda Alexandra Silva ^{a,b}, Tânia Gonçalves Albuquerque ^{a,b}, Rita C. Alves ^b, M. Beatriz P.P. Oliveira ^b, Helena S. Costa ^{a,b*}

^a Unidade de Investigação e Desenvolvimento, Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P., Lisboa, Portugal

^b REQUIMTE-LAQV/Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, Portugal

* helenacosta@insa.min-saude.pt

Palavras-chave: *Cucumis melo* L., composição nutricional, sustentabilidade, alimento funcional

RESUMO

O desperdício alimentar é uma preocupação crescente em todo o mundo, sendo considerado um problema com impacto direto na economia, sociedade e ambiente. A sua gestão torna-se, portanto, uma questão crucial para a disponibilidade alimentar. O interesse na utilização dos subprodutos da indústria agroalimentar para a formulação e/ou enriquecimento de novos produtos alimentares tem vindo a aumentar, e parece ser uma solução sustentável, permitindo ir ao encontro das necessidades dos consumidores.

Este estudo tem como objetivo fornecer uma visão geral da composição nutricional de um subproduto do melão, de modo a avaliar o seu potencial como ingrediente alimentar.

As sementes do melão são uma boa fonte de lípidos (13 - 37%), proteína (15 - 36%), fibra alimentar (0,2 - 24%), minerais (potássio, magnésio e cálcio) e aminoácidos (ácido glutâmico, arginina e ácido aspártico). Constituem um potencial ingrediente alimentar que pode ser utilizado para enriquecer alimentos e conferir-lhes propriedades benéficas, com vista à promoção da saúde e bem-estar dos seus consumidores. Para além disso, a sua utilização pode ser um aspeto muito importante para a gestão dos resíduos alimentares e contribuir para uma produção mais sustentável, diminuindo o impacto social, económico e ambiental.

1. INTRODUÇÃO

O desperdício alimentar pode ser definido como a matéria-prima crua ou cozida, incluindo qualquer tipo de material alimentar descartado em qualquer ponto do ciclo de vida do alimento, entre a exploração e o prato do consumidor [1].

A Comissão Europeia tem como objetivo a redução do desperdício alimentar para estimular a transição da Europa para uma economia circular. A implementação deste tipo de economia aumenta a competitividade global, promove o crescimento sustentável e gera novos empregos [2].

A indústria alimentar, nomeadamente as indústrias de produção de sumos de frutas, são grandes produtoras de resíduos alimentares, devido à elevada quantidade de cascas e sementes que geralmente são descartadas. No entanto, esses resíduos alimentares podem ter um grande

potencial para serem incluídos na dieta alimentar, sobretudo os que são ricos em vitaminas, minerais, fibras e compostos bioativos com propriedades funcionais [3].

A utilização dos subprodutos alimentares para desenvolver produtos inovadores com valor acrescentado é muito importante para a sustentabilidade, sendo uma solução para reduzir as perdas dos alimentos, o desperdício alimentar e o impacto ambiental. A produção sustentável de alimentos está a tornar-se um dos desafios mais importantes que a indústria alimentar tem de enfrentar, e deve basear-se na redução de custos, no aumento da diferenciação de produtos e na satisfação das necessidades dos consumidores [1].

O melão (*Cucumis melo* L.) é uma cultura hortícola muito importante em diversas áreas do mundo. É cultivada em diferentes países com clima temperado, na Europa, Ásia e África, e também em regiões áridas [4,5]. O melão apresenta uma grande variabilidade morfológica, em características como o tamanho, forma, cor, textura e sabor, sendo uma das espécies do género *Cucumis* com maior diversidade [6].

O objetivo deste estudo foi fornecer uma visão geral da composição nutricional das sementes do melão, com o intuito de avaliar o seu potencial como ingrediente alimentar.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A revisão bibliográfica foi realizada em três bases de dados, Web of Science, Sciencedirect e b-on. A pesquisa foi limitada ao período entre 2000 e 2018, tendo sido utilizadas as palavras-chave: “melon seeds”, “melon byproducts”, “composition melon seeds”.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como se pode ver pela Figura 1, as sementes do melão podem ser consideradas uma boa fonte de lípidos (13 – 37%), proteína (15 – 36%) e fibra alimentar (0,2 - 24%) [4, 8-10].

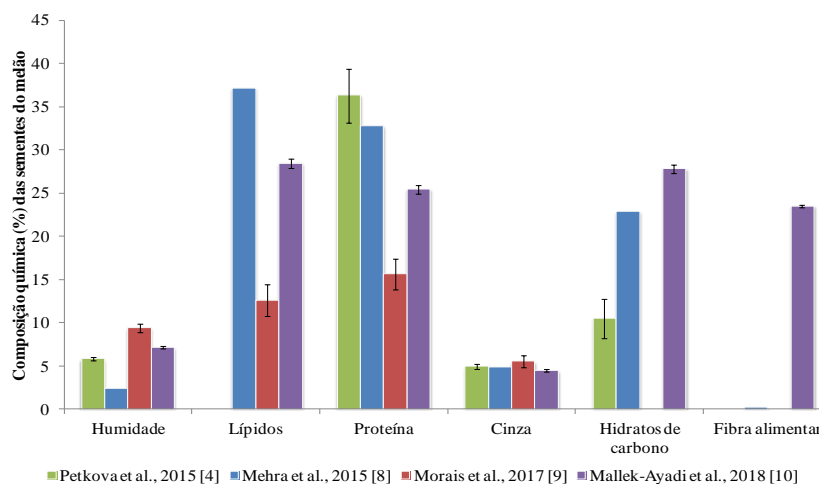


Figura 1. Composição nutricional (%) das sementes do melão.

De acordo com a Figura 2, as sementes do melão são uma boa fonte de minerais, sendo o potássio (1040 – 1887 mg/100 g), magnésio (90 – 1062 mg/100 g) e cálcio (23 – 806 mg/100 g) os maioritários [9,11,12].

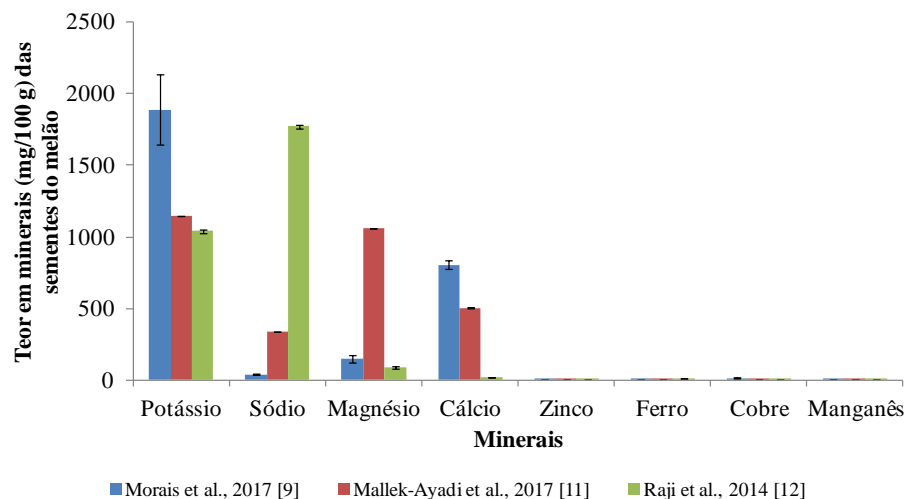


Figura 2. Teor em minerais (mg/100 g) das sementes do melão.

Através da Figura 3, é possível verificar que na fração proteica das sementes de melão o teor em alguns aminoácidos é particularmente interessante. Os principais aminoácidos presentes são a arginina (12 – 16% proteína), ácido glutâmico (18 – 20% proteína) e ácido aspártico (9 – 10% proteína) [13-15].

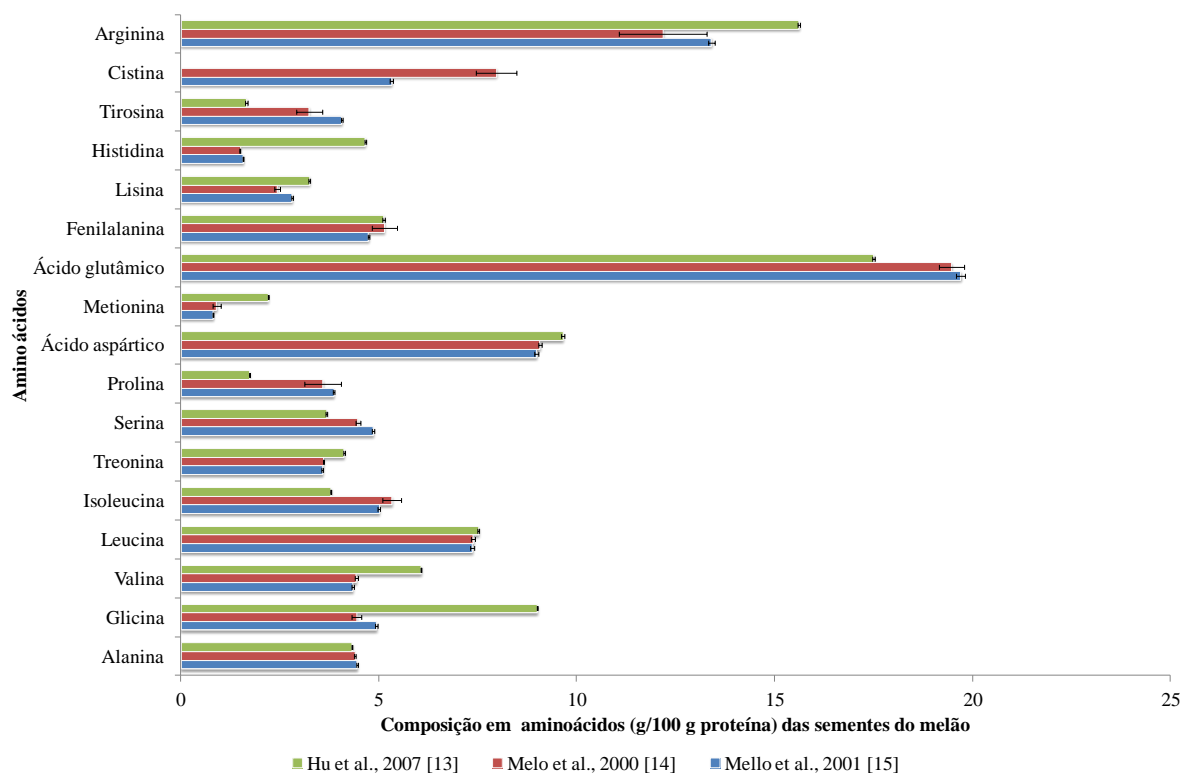


Figura 3. Composição em aminoácidos (g/100 g proteína) das sementes do melão.

4. CONCLUSÕES

As sementes do melão são uma potencial fonte de ingredientes alimentares naturais e pode ser utilizado para enriquecer e desenvolver novos alimentos com propriedades benéficas para a saúde e bem-estar dos seus consumidores. A utilização do subproduto do melão é também um aspeto muito importante para a gestão de resíduos alimentares e pode ajudar numa produção mais sustentável da indústria alimentar, contribuindo para a diminuição do impacto social, económico e ambiental.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo INSA, I.P., no âmbito do projeto MELON4FOOD (2018DAN1492) e pela União Europeia (FEDER financia através do COMPETE), ao abrigo do Acordo de Parceria PT2020, e Fundos Nacionais (FCT) no âmbito do projeto LAQV/UID/QUI/50006/2013 e NORTE-07-0124-FEDER-000069 – Food Science. T. G. Albuquerque e M. A. Silva agradecem as Bolsas de Doutoramento (SFRH/BD/99718/2014 e PD/BD/142932/2018) financiadas pela FCT, FSE, MEC e MCTES.

Referências

- [1] Comissão Europeia, Functional foods, 2010. Retirado de http://www.eurosfair.pr.fr/7pc/documents/1276590504_functional_foods_en_publi_ce.pdf
- [2] Comissão Europeia. Relatório da Comissão ao Parlamento Europeu, ao Conselho, ao Comité Económico e Social Europeu e ao Comité das Regiões sobre a implementação do plano de ação para a economia circular, 2017, 1 – 14.
- [3] AC Silva, N Jorge, Food Res Int, 2014, 66, 493 – 500.
- [4] Z Petkova, G Antova, Cogent Food Agric, 2015, 1.
- [5] International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Descriptors for Melon (*Cucumis melo* L.), 2003, Roma.
- [6] D Maynard, D Maynard, Cucumbers, Melons, and Watermelons, The Cambridge World History of Food, 2000, Cambridge University Press.
- [7] MA Silva, TG Albuquerque, R Alves, MBPP Oliveira, HS Costa, Trends Food Sci Technol, 2018, In press, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.005>.
- [8] M Mehra, V Pasricha, RK Gupta, J Pharmacogn Phytochem, 2015, 3, 98 – 102.
- [9] DR Morais, EM Rotta, ..., JV Visentainer, J Brazil Chem Soc, 2017, 28, 308 – 318.
- [10] S Mallek-Ayadi, N Bahloul, N Kechaou, Process Saf Environ, 2018, 113, 68–77.
- [11] S Mallek-Ayadi, N Bahloul, N Kechaou, Food Chem, 2017, 221, 1691 – 1697.
- [12] OH Raji, OT Orelaja, Food Science and Quality Management, 2014, 27, 18 – 22.
- [13] MH Hu, Y Ao, International Journal of Food Science and Technology, 2007, 42, 1397 – 1401.
- [14] MLS Melo, N Narain, PS Bora, Food Chem, 2000, 68, 411 – 414.
- [15] MLS Mello, PS Bora, N Narain, J Food Compos Anal, 2001, 14, 69 – 74.

Teores de Vitamina C do Figo-da-Índia e da Anona: Comparação entre polpa e subprodutos

*Mafalda Alexandra Silva^{a,b}, Tânia Gonçalves Albuquerque^{a,b}, M. Beatriz P.P. Oliveira^b,
Paula Pereira^{c,d,e}, Renata Ramalho^{c,d,e}, Helena S. Costa^{a,b*}*

^a Unidade de Investigação e Desenvolvimento, Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P., Lisboa, Portugal

^b REQUIMTE-LAQV/Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, Portugal

^c Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Caparica, Portugal;

^d CiiEM - Centro de Investigação Interdisciplinar Egas Moniz, Caparica, Portugal;

^e GENA - Grupo de Estudos de Nutrição Aplicada, Caparica, Portugal

* helenacosta@insa.min-saude.pt

Palavras-chave: subprodutos, sustentabilidade, valorização, ácido L-ascórbico

RESUMO

A vitamina C não é sintetizada pelos seres humanos, tendo por isso de ser obtida pela alimentação. É crucial para a saúde e bem-estar do indivíduo assegurar um aporte adequado desta vitamina. O figo-da-Índia e a anona são dois frutos exóticos muito apreciados devido às suas propriedades sensoriais diferenciadas. Do seu consumo resultam grandes quantidades de subprodutos que são descartadas, mas que podem ser fonte de compostos bioativos, com propriedades benéficas para a saúde.

Este trabalho teve como objetivo a comparação dos teores dos ácidos L-ascórbico e desidroascórbico e da vitamina C total, determinados na polpa e em subprodutos dos referidos frutos, com o intuito de avaliar o potencial dos seus extratos como ingredientes de novos produtos alimentares. As amostras de anona foram fornecidas por uma empresa da Madeira (Portugal) e as amostras de figo-da-Índia foram obtidas na Herdade de Peliteiros (Silveiras, Montemor-o-Novo, Évora, Portugal). A quantificação da vitamina C foi realizada por cromatografia líquida acoplada à deteção por díodos. As amostras de figo-da-Índia apresentaram teores mais elevados de vitamina C tanto para a polpa (35 mg/100 g de amostra) como para o subproduto (132 mg/100g). Pelo contrário na anona obteve-se um teor mais elevado de ácido desidroascórbico (6 mg/100 g de parte edível) na polpa.

Pelos resultados parece possível concluir que o figo-da-Índia é uma boa fonte de vitamina C, especialmente o subproduto. Este trabalho poderá promover uma nova abordagem de valorização destes frutos, contribuindo para a sustentabilidade ambiental e económica.

1. INTRODUÇÃO

A vitamina C é uma importante vitamina hidrossolúvel que está presente nos alimentos, em especial em frutas e hortícolas. Os seres humanos não a conseguem sintetizar, e como tal, a única forma de a obter é através da alimentação. É muito utilizada como aditivo alimentar e

como antioxidante. A sua ingestão em quantidades adequadas é muito importante, devido ao papel crucial que esta vitamina tem para a saúde e bem-estar do indivíduo [1]. A forma reduzida da vitamina C, ácido L-ascórbico, é a sua principal forma biologicamente ativa e é um poderoso antioxidante devido ao seu elevado poder de doação de eletrões e rápida conversão à forma ativa reduzida [2].

O interesse nas frutas exóticas tem vindo a aumentar nos últimos anos devido, essencialmente, às suas atraentes propriedades sensoriais e por serem consideradas uma boa fonte de vitaminas e compostos bioativos [2].

Um exemplo dessas frutas é a anona (*Annona cherimola* Mill.). A anona pertence à família Annonaceae e tem a sua origem em regiões tropicais. Apresenta uma casca verde espessa e a sua polpa é cremosa e doce. Para além disso, é muito conhecida pelo seu sabor excecional e está a tornar-se cada vez mais importante em regiões tropicais e subtropicais, devido à sua implicação na medicina popular [3].

Outro exemplo é o *Opuntia ficus-indica*, ou mais comumente conhecido como figo-da-Índia. Taxonomicamente, pertence à família Cactaceae, e o seu género é o grupo mais comercializado, com cerca de 300 espécies. O figo-da-Índia é originário do México e está amplamente distribuído em toda a América Central, América do Sul, Austrália, África do Sul e países do Mediterrâneo. É um fruto oval e alongado, com um pericarpo espesso, uma polpa muito succulenta e gelatinosa e com muitas sementes. As suas cores variam entre o vermelho, laranja, amarelo e verde, com a polpa da mesma cor [4-8].

O consumo destas duas frutas gera grandes quantidades de subprodutos, que são normalmente descartados, mas que podem ter propriedades benéficas para a saúde, devido à presença de compostos bioativos.

O objetivo deste trabalho foi comparar os teores dos ácidos L-ascórbico e desidroascórbico e da vitamina C total, determinados na polpa e nos subprodutos (casca) da anona e do figo-da-Índia, para avaliar o potencial dos seus extratos como ingredientes de novos produtos alimentares.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras

As amostras de anona foram fornecidas por uma empresa da Madeira (Portugal) e as amostras de figo-da-Índia foram obtidas na Herdade de Peliteiros (Silveiras, Montemor-o-Novo, Évora, Portugal). As amostras foram posteriormente separadas, manualmente, em parte edível (polpa) e parte não edível (casca). Em seguida, foram homogeneizadas num misturador (Grindomix, GM200, RETSCH, Alemanha) durante 1 minuto a 5000 rpm, aproximadamente. A preparação das amostras foi feita sob proteção da luz e temperatura controlada de modo a minimizar as perdas de vitamina C.

2.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE VITAMINA C

A determinação do teor de vitamina C total e ácido L-ascórbico foi baseada no descrito por Valente et al. (2014) [9]. Resumidamente, a 4 g de cada amostra foram adicionados 12 mL de uma solução estabilizadora (10% (v/v) de ácido perclórico e 1% (p/v) de ácido metafosfórico em água ultrapura). A esta solução foi adicionada fase móvel, até perfazer um volume de 50 mL. Para a determinação da vitamina C total, foi adicionado 1 mL de Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) (5mM) à solução anterior. De seguida, procedeu-se a duas filtrações, primeiro com filtro de papel de 150 mm de diâmetro e depois com filtro de seringa PVDF de 0,45 µm, para posterior injeção no sistema cromatográfico.

A separação e quantificação da vitamina C foram realizadas num sistema de cromatografia líquida de alta resolução acoplada à deteção por díodos. A fase móvel consistiu em dihidrogenofosfato de amónio 20 mM, pH 3,5 (ajustado com ácido ortofosfórico a 85%) e contendo 0,015 % (p/v) de ácido metafosfórico. O tempo total de corrida foi de 6 minutos a um fluxo de 0,6 mL/min. O sinal de deteção foi registado a 245 nm.

Cada uma das amostras foi analisada em triplicado e os resultados estão expressos em mg/100 g de amostra.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como se pode observar pela Figura 1, as amostras de figo-da-Índia apresentaram teores mais elevados de vitamina C para a polpa (35 mg/100 g de parte edível) e para a casca (132 mg/100 g) [10]. Por outro lado, a polpa da anona apresentou um teor mais elevado de ácido desidroascórbico (6 mg/100 g de parte edível) [10].

A dose diária de referência (DDR) para adultos para a vitamina C é de 80 mg [11]. Se considerarmos uma porção de 100 g/dia, a polpa do figo-da-Índia poderá contribuir com 43% da DDR. Por outro lado, a polpa da anona poderá contribuir apenas com 8%.

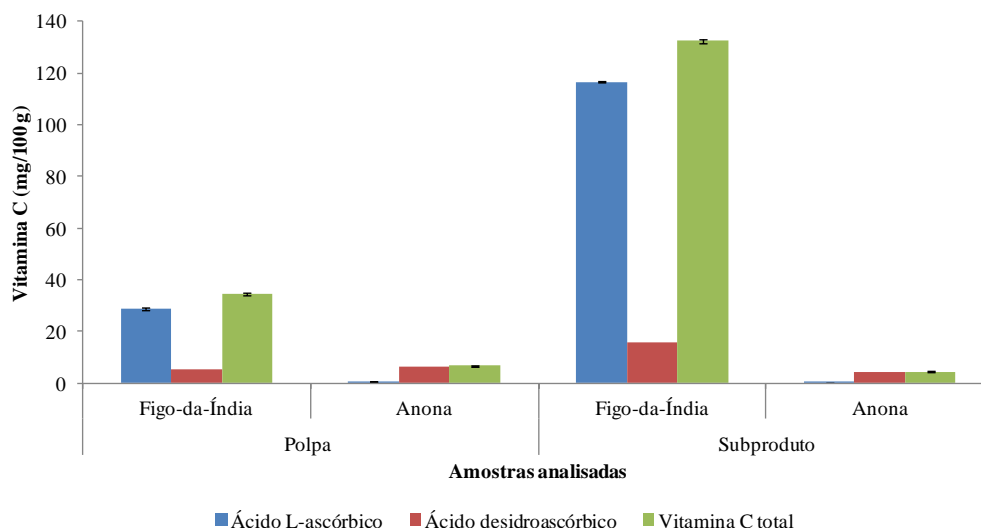


Figura 4. Teores de vitamina C total e ácidos L-ascórbico e desidroascórbico (mg/100 g) das amostras analisadas.

4. CONCLUSÕES

Com este trabalho foi possível concluir que o figo-da-Índia pode ser uma boa fonte de vitamina C, em especial o seu subproduto (casca).

Por outro lado, este trabalho poderá também contribuir para a promoção de novas abordagens no que diz respeito à valorização destes frutos, especialmente os seus subprodutos, tendo como objetivo a contribuição para uma sustentabilidade ambiental e económica.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo INSA, I.P., no âmbito do projeto BioCOMP (2012DAN730) e pela União Europeia (FEDER financia através do COMPETE), ao abrigo do Acordo de Parceria PT2020, e Fundos Nacionais (FCT) no âmbito do projeto LAQV/UID/QUI/50006/2013 e NORTE-07-0124-FEDER-000069 – Food Science. T.G. Albuquerque e M.A. Silva agradecem as Bolsas de Doutoramento (SFRH/BD/99718/2014 e PD/BD/142932/2018) financiadas pela FCT, FSE, MEC e MCTES.

Referências

- [1] MA Silva, TG Albuquerque, MBPP Oliveira, HS Costa, Food Chem, 2018, 267, 83-90.
- [2] A Valente, TG Albuquerque, A Sanches-Silva, HS Costa, Food Res Int, 2011, 44, 2237-2242
- [3] IA Amoo, AE Emenike, VOE Akpambang, Trends Appl Sci Res, 2008, 3, 216-220
- [4] Y Mohamed-Yasseen, SA Barringer, WE Splittstoesser, 1996, J Arid Environ, 32, 347 – 353
- [5] M Leo, MB De Abreu, AM Pawlowska, PL Cioni, A Braca, 2010, Phytochem Lett, 3, 48 – 52
- [6] Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), Agro-industrial utilization of cactus pear. Roma, 2013. Retirado de <http://www.fao.org/docrep/019/a0534e/a0534e.pdf>
- [7] Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), Crop ecology, cultivation and uses of cactus pear, Roma, 2017. Retirado de <http://www.fao.org/3/a-i7012e.pdf>
- [8] Integrated Taxonomic Information System (ITIS), Integrated Taxonomic Information System Report, 2017. Retirado de https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=22362#null.
- [9] A Valente, A Sanches-Silva, TG Albuquerque, HS Costa, Food Chem, 2014, 154, 71-77
- [10] TG Albuquerque, F Santos, A Sanches-Silva, MB Oliveira, AC Bento, HS Costa, Food Chem, 2016, 193, 187-95
- [11] Regulamento (UE) N° 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Outubro de 2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, Jornal Oficial da União Europeia, L 304, 18-63.

Integração de processos de membrana na valorização de soro de cabra

David Azedo^a, Antónia Macedo^{a,}, Teresa Santos^a, Carlos Pereira^b, Marta Henriques^b, David Gomes^b, Raquel Borges^b*

^aInstituto Politécnico de Beja, Beja, Portugal

^b Instituto Politécnico de Coimbra, Coimbra, Portugal

* atmacedo@ipbeja.pt

Palavras chave: processos de membrana; soro de cabra; valorização

RESUMO

O interesse pelo estudo do leite de cabra e produtos derivados tem vindo a crescer bastante devido ao seu valor nutricional, propriedades biológicas e funcionais, assim como aos seus potenciais efeitos benéficos para a saúde. Com o objetivo de valorizar o soro de cabra este trabalho é focado no estudo da eficiência de uma sequência de processos de separação por membranas, para a obtenção de diferentes frações valiosas. O soro de cabra doce, após um conjunto de pré-tratamentos, é sujeito à seguinte sequência de processos membranares: ultrafiltração/diafiltração, seguido de nanofiltração/diafiltração dos permeados obtidos nos primeiros processos. Todos os ensaios foram realizados num módulo de pratos planos e paralelos, com uma área superficial total de membrana 0.072 m². Os ensaios de ultrafiltração/diafiltração, realizados com membranas orgânicas com um peso molecular de corte de 10 kDa, permitiram obter um concentrado de proteína purificado de concentração cerca de 80%. Nos ensaios de nanofiltração/diafiltração dos permeados foram também utilizadas membranas orgânicas, as quais permitiram a recuperação de quase toda a lactose no concentrado, tendo-se obtido um permeado final com um teor muito baixo de matéria orgânica. A aplicação de todas as frações separadas no desenvolvimento de novos produtos irá ser investigada em trabalhos futuros.

1. INTRODUÇÃO

O soro de queijo retém 55% dos nutrientes encontrados no leite, nomeadamente a lactose, o principal hidrato de carbono do leite, proteínas, péptidos, lípidos, sais minerais e vitaminas [1], pelo que representa um grande potencial como fonte de compostos de valor acrescentado, um desafio que a indústria deve enfrentar como um recurso e não como um problema de resíduos, o que atualmente acontece ainda bastante. Comparativamente aos soros de queijo de vaca e de ovelha, o soro do queijo de cabra é particularmente rico em oligossacáridos, cujas estruturas são semelhantes às do leite humano, e compostos de azoto não proteico, nomeadamente nucleótidos e aminoácidos livres, o que o torna bastante adequado para a conceção de alimentos para crianças, evitando a adição externa destes componentes nutricionais [2]. A utilização de processos de membrana, mais limpos e de menor consumo energético em relação aos processos

convencionais, como por exemplo a evaporação, torna-os bastante competitivos em termos económicos e ambientais. Na indústria alimentar, os processos de membrana mais utilizados atualmente para a separação de componentes de elevado valor acrescentado são a microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e a osmose inversa. Para a separação dos principais componentes do soro (proteínas do soro, péptidos, lactose e outros hidratos de carbono, lípidos e minerais), a utilização sequencial de dois ou mais destes processos, associados a diafiltração e utilizando membranas e condições operatórias otimizadas (pressão transmembranar, velocidade de circulação e temperatura) e equipamento adequado, pode permitir a separação/concentração de compostos valiosos. Este trabalho, desenvolvido no âmbito das atividades propostas pelo projeto LACTIES (Lacticínios, Eco-eficiência, Inovação e Segurança em PME's de lacticínios) tem como objetivo estudar a eficiência da separação de vários componentes valiosos presentes no soro de queijo de cabra, através da realização de uma sequência de vários processos membranares, nomeadamente ultrafiltração/diafiltração, seguido da nanofiltração/diafiltração dos permeados obtidos nos primeiros processos. Com base nos resultados obtidos, irão ser desenvolvidos novos produtos, a partir das frações separadas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Um volume total de 180 litros de soro de queijo de cabra inteiro, obtido numa queijaria tradicional do concelho de Beja foi recolhido durante um período de 3 meses, de Março a Maio de 2018. De forma a evitar a colmatação das membranas e possíveis contaminações, as amostras de soro de queijo de cabra foram submetidas a um conjunto de pré-tratamentos sequenciais nomeadamente: a) filtração em panos de algodão, para remover impurezas e restos de coalhada, presentes no soro; b) desnate em desnatadeira centrífuga vertical, de forma a reduzir o teor de gordura do soro; c) tratamento térmico em imersão a 65°C, durante 30 minutos, de forma a destruir possíveis microrganismos patogénicos e d) arrefecimento até à temperatura ambiente, devido à resistência térmica das membranas.

2.2 Membranas e módulo de filtração

Nos ensaios de ultrafiltração/diafiltração foram usadas membranas orgânicas de peso molecular de corte de 10 kDa, referenciadas como RC70PP. Nos ensaios de nanofiltração/diafiltração usaram-se membranas orgânicas, designadas por NFT50. Todas as membranas foram adquiridas à Alfa Laval, Dinamarca. A unidade de permeação Lab Unit M20, comercializada pela Alfa Laval, Dinamarca, é constituída por um módulo de pratos planos e paralelos, com uma área máxima de membrana de 0.72 m² e com possibilidade de trabalhar em microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa.

2.3 Ensaios de permeação

Foram realizados ensaios de ultrafiltração e de nanofiltração dos permeados da ultrafiltração, em modo de recirculação total, a fim de selecionar a pressão transmembranar mais adequada à

separação das seguintes frações: proteica e fração rica em lactose e minerais. A seleção da pressão transmembrana ótima foi realizada com base na determinação dos fluxos de permeado, medidos a várias pressões transmembranares, assim como dos coeficientes de rejeição aparente aos diferentes componentes analisados. A determinação destes parâmetros foi usada para avaliar a produtividade e seletividade destes processos. Foram então realizados os ensaios de ultrafiltração/diafiltração e de nanofiltração/diafiltração dos permeados obtidos, em modo de concentração, até um fator de concentração volumétrico de aproximadamente 3. As pressões transmembranares selecionadas para ultrafiltração e nanofiltração, através dos resultados obtidos nos ensaios em modo de recirculação total, foram respetivamente, 2.0×10^5 Pa e 2.0×10^6 Pa. O plano experimental deste trabalho está representado na figura 1.

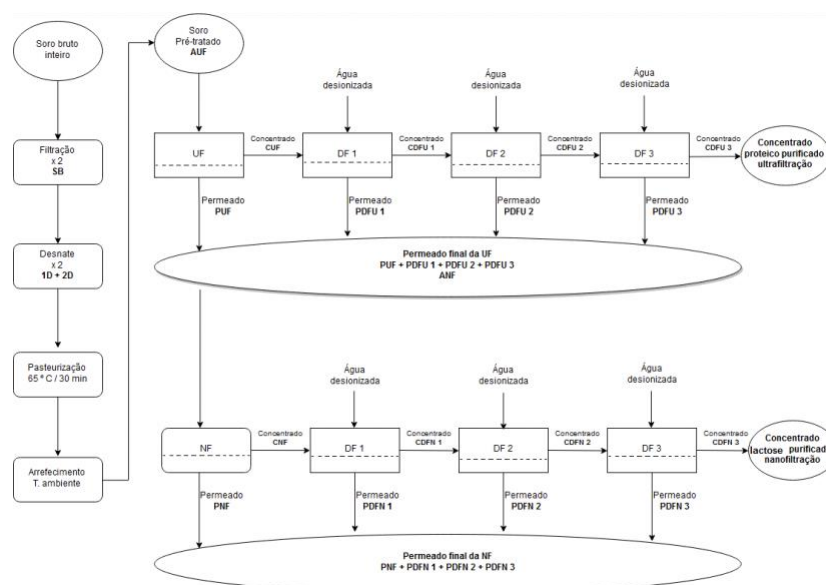


Figura 1 – Plano experimental

2.4 Caracterização das amostras

As amostras de soro de queijo de cabra inteiro, soro de queijo de cabra pré-tratado, concentrados e permeados, separados pelos vários processos de membrana foram analisadas em termos físico-químicos e microbiológicos. As características físico-químicas analisadas, realizadas de acordo com os métodos de referência, foram as seguintes: pH, condutividade elétrica, sólidos totais, cinzas, proteína bruta, lactose, matéria gorda, cloretos, fosfatos, sódio, potássio, cálcio e magnésio. A caracterização microbiológica envolveu a análise dos parâmetros seguintes: contagem total de mesófilos a 30°C, contagem de *Escherichia coli*, pesquisa de *Listeria monocytogenes* e pesquisa de *Salmonella spp.* Os parâmetros microbiológicos foram também analisados de acordo com normas portuguesas ou ISO.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os pré-tratamentos mostraram-se eficazes na redução do teor de gordura e sólidos totais do soro de queijo de cabra inteiro. Nos ensaios de ultrafiltração, em modo de concentração, verificou-se um decréscimo inicial dos fluxos de permeado devido à polarização de concentração, seguido

de uma tendência estável e constante, indicando que as membranas não colmataram (figura 2). Nos ensaios de nanofiltração em modo de concentração, o abaixamento dos fluxos de permeado foi maior, principalmente devido ao aumento da pressão osmótica causado pela presença de concentrações elevadas de cloreto de sódio e também da elevada retenção de lactose [3]. As operações de diafiltração, realizadas quer após a ultrafiltração ou a nanofiltração permitiram a obtenção de concentrados proteicos e de lactose purificados. A caracterização microbiológica das correntes fracionadas permitiu observar a ausência dos microrganismos patogênicos estudados, uma maior concentração de microrganismos nos concentrados, possivelmente de bactérias lácticas, a tendência estéril dos permeados obtidos por nanofiltração e a redução do número de microrganismos em relação ao soro bruto inteiro, confirmando a eficiência do tratamento térmico aplicado nos pré-tratamentos.

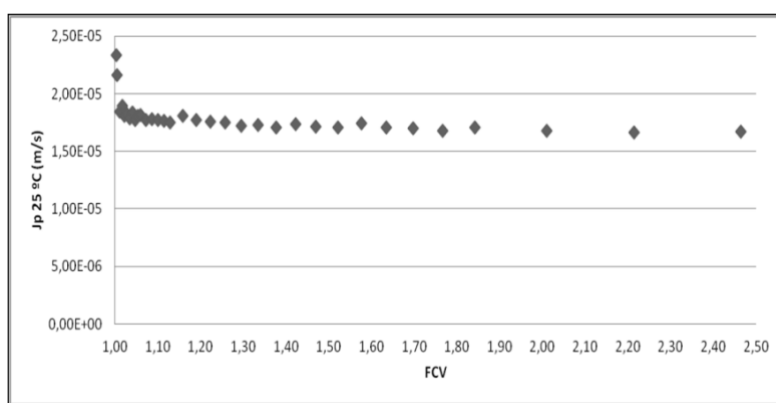


Figura 2 - Evolução dos fluxos de permeado em função do fator de concentração volumétrico nos ensaios de ultrafiltração realizados com as membranas RC70PP

Agradecimentos

A equipa agradece ao Programa de Financiamento PDR2020, através do projeto LACTIES - PDR2020-101-030773.

Referências

- [1] Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., & Gómez-Ruiz, J. Á. (2011). Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Ruminant Research*, 101(1-3), 196–204.
- [2] Macedo, A., Duarte, E., & Fragoso, R. (2014). Assessment of the performance of three ultrafiltration membranes for fractionation of ovine second cheese whey. *International Dairy Journal*, 48, 31–37.

Characterization of concentrated second cheese whey

Margarida Faustino^a, Ana Sofia Salsinha^a, Lúcia Pimentel^a, Luís Alcalá^a, Ana Cristina Freitas^a, Ana Maria Gomes^a, Carlos Dias Pereira^b, Manuela Pintado^{a}*

^a Universidade Católica Portuguesa, CBQF – Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Porto, Portugal

^b IPC/Escola Superior Agrária, Departamento de Ciência e Tecnologia Alimentar, Bencanta, Coimbra, Portugal

* corresponsor author e-mail (mpintado@porto.ucp.pt)

Keywords: goat and sheep second cheese wheys, nutritional characterization, total amino acids, fatty acids

ABSTRACT

The residual deproteinized whey known as second cheese whey or “Sorelho”, is a byproduct obtained from whey cheese manufacture. It is commonly obtained in small/medium scale cheese plants and, although it has little to no commercial value, it is produced in relatively high volumes, which results in a complex disposal process. Therefore, the objective of this work was to characterize the nutritional composition of two concentrated deproteinized wheys (sheep and goat), obtained through ultrafiltration/diafiltration with a 10 kDa membrane followed by freeze-drying. From the nutritional standpoint, it was possible to observe that after ultrafiltration, samples were mostly comprised of protein 75-58% (w/w). Samples also exhibited a low mineral and lactose contents (1.7-3.9% (w/w) and 0.93 -69%(w/w), respectively). The fatty acid composition profile was predominantly composed of short- and medium chain fatty acids including butyric, caproic and caprylic acids, with long chain fatty acids, such as palmitoleic, rumenic, trans vaccenic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids being also detected in both goat and sheep Sorelho, but in the goat Sorelho the concentration was bigger of these fatty acids. When regarding the amino acids identified aspartic acid, glutamic acid, alanine and tyrosine were the most predominant amino acids found in the sheep Sorelho while in the goat Sorelho aspartic acid, glutamic acid, asparagine, threonine and valine were prevalent. Overall, these results provide some insights into Sorelhos’ potential usage as source of bioactive compounds for posterior incorporation into foods.

1. INTRODUCTION

Whey cheese is a dairy product produced mainly from ovine or goat cattle milk in the Mediterranean countries [1]. “Requeijão”, the Portuguese name of traditional whey cheese is manufactured from raw or pasteurized skimmed milk through heating of whey at temperatures between from 90 to 100 °C for 15–30 min, with or without the addition of 10 -20 % of ovine/caprino/bovine milk [1]. The residual “deproteinized” whey called Sorelho or as second cheese whey, contains approximately 60% of the original dry matter of whey. Despite residual fat and non-thermally precipitated nitrogen components being also present, lactose and minerals are the main components of Sorelho dry mass, making it an environmental threat and impeding its direct disposal without treatment [2]. Hence, attempts to recover some of these components

before final disposal is of great interest. The objective of this work was to characterize the nutritional composition of two freeze drying concentrated deproteinized wheys (sheep and goat), obtained after the treatment by ultrafiltration/diafiltration with a 10 kDa membrane.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Concentrated deproteinized wheys

Goat's and sheep's Sorelho was supplied by Escola Superior Agrária de Coimbra, the Sorelho was filtered, using a cloth filter in order to separate suspended particle material and then processed at 45-50 °C using a filtration pilot plant equipped with an organic Parker™ membrane (SD3838 BS 03S, 6.3 m²) and a 10 kDa cutoff. After the first concentration step, the diluted retentate (volumetric concentration factor (VCF) of 20.225L of water were added to the 25 L of retentate) was submitted to second concentration step using the same membrane. Finally, the diafiltered retentate was submitted to reverse osmosis using a pilot plant equipment equipped with a membrane Seawater model 2.5 S using a VCF of 5. The final concentrated retentate was freeze dried.

2.2 Nutritional Composition

Total protein content was determined via Kjeldahl method (IDF, 1985). Total ashes were determined according to the standard international method (ISO 2171:2004). The lactose concentration in samples was determined by HPLC (Beckman Coulter System Gold HPLC) equipped with a refractometer (Knauer, Berlin, Germany), using a Ultrahydrogel 250 coupled to an Ultrahydrogel 120 columns (Waters, Milford, USA). All analysis were performed in duplicate.

2.3 Fatty Acids

Fatty acid qualitative and quantitative profiles were determined according to Pimentel et al. [3]. All analysis were performed in duplicate.

2.4 Total Amino Acids

The total amino acid determination was performed through HPLC (HPLC Gold 128 Solvent module, Beckman Coulter, USA) with a High-Resolution Fluorescence Detector (Waters 474, USA) and an autosampler (model 410 Varian prostar, Agilent technologies, USA) according to Pripis-Nicolau et al. [4]. All analysis were performed in duplicate.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.2 Nutritional Composition

In Table 1 it is possible to observe the nutritional compositional of goat and sheep Sorelho. The composition of goat sample showed to be 58±0.96 to protein, 1.7±0.056 ashes and 0.93±0.19 lactose (%), and the composition of sheep samples showed to be 75±2.4 to protein, 3.9±0.28 ashes and 69±1.1 lactose (%). The processing (ultrafiltration/diafiltration) applied

to goat and sheep second cheese whey allowed to obtain two protein concentrates with minerals (lower level in goat sample) and lactose demonstrating a potential nutritional value.

3.3 Fatty Acids

The fatty acids profile of the samples was analysed for short-chain fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA). In the literature there are no previous studies describing the fatty acid profile of goat and sheep concentrated second cheese whey, so no comparisons can be drawn. Nevertheless, is interesting to note that although both samples analysed presented a profile rich in fatty acids, goat's sample showed the richest profile, as it presented higher concentrations than sheep's sample.

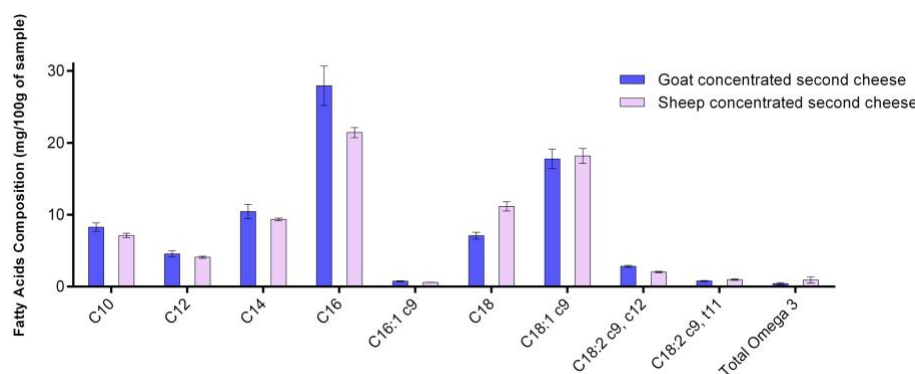


Figure 1. Free fatty acids profile of the goat and sheep samples analysed. All results correspond to an average of all samples analysed for sheep and goat. Results in mg/100g of sample.

The most prevalent fatty acids in the samples of goat and sheep concentrated second cheese whey are depicted in **Figure 1**. The palmitoleic acid (C16:1c9), oleic acid (C18:1c9) are the most relevant MUFA acids. It was also possible to detect the presence of PUFA acids such as rumenic acid (C18:2c9t11), EPA, DHA and α – linolenic acid (C18:3c9c12c15), although both were detected in low concentrations.

3.4 Total Amino Acids

The free amino acid profile present in both goat and sheep concentrated second cheese whey are presented in **Figure 2**.

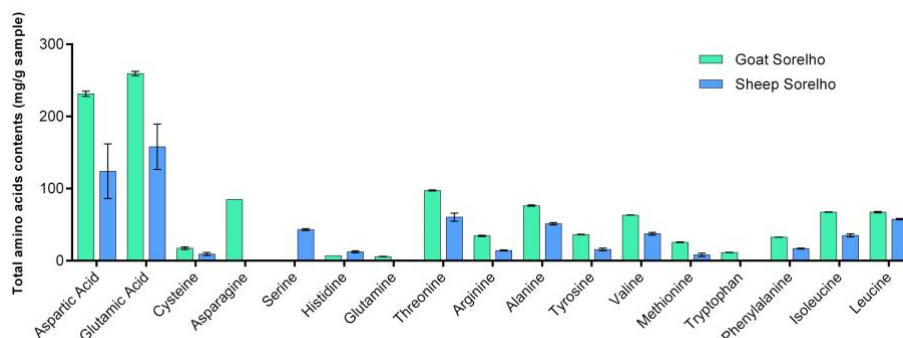


Figure 2. Free amino acids content of the goat and sheep concentrated second cheese wheys.

Goat concentrated second cheese whey revealed the highest concentrations of free amino acids. Aspartic and glutamic acids were those found in higher concentrations in both cases. We can also observe that the amino acids asparagine, glutamine and tryptophan were only present on goat concentrated second cheese whey, unlike the amino acid serine, which was only detected and quantified in sheep concentrated second cheese whey.

4. CONCLUSION

The application of membrane processing (ultrafiltration/diafiltration) to goat and sheep second cheese whey allowed to obtain two innovative ingredients with high nutritional profile with relevant fatty acid and free amino acid profiles. Their application in different matrices may be sought to develop innovative functional foods.

Acknowledgements

This work was supported by Ministry of Agriculture and Rural Development and co-financed by the European Agricultural Fund for Rural Development (EAFRD), through the partnership agreement Portugal 2020 – PDR, under the project PDR2020-101-030775: Lacties, Inovação, Eco-Eficiência e Segurança em PME's do Sector dos Lacticínios. We would also like to thank the scientific collaboration of CBQF under the FCT project UID/Multi/50016/2013.

References

- [1] CD Pereira, O Díaz, A Cobos, Food Technology and Biotechnology, 2007, 45, 32-37
- [2] CD Pereira, O Díaz, A Cobos, International Dairy Journal, 2002, 12, 773-783
- [3] Pimentel, L.; Fontes, A.; Gomes, A.; Alcalá, L. MethodsX 2 2015, 475-484.
- [4] L Pripis-Nicolau, G Revel, A Bertrand, A Maujean, J Agric Food Chem, 200, 48, 3761-3766

Rendimento da extração e atividade antioxidante de extratos de casca de pinheiro (*Pinus pinaster* Aiton subsp. *Atlantica*): efeito do solvente e método de extração

*Catarina Vieito**, Preciosa Pires, Élia Fernandes, Carina Lopes, Manuela Vaz Velho

Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Viana do Castelo, Portugal

* cvieito@ipvc.pt

Keywords: casca de pinheiro; extração; polifenóis; atividade antioxidante

RESUMO

Os extratos de casca de pinheiro são conhecidos por possuírem várias propriedades bioativas, nomeadamente antioxidante e antimicrobiana, conferidas pelos compostos fenólicos. Deste modo, os extratos de casca de pinheiro apresentam grande interesse para aplicação em alimentos [1]. O objetivo deste estudo foi a determinação do efeito do método e do solvente de extração no rendimento do processo e da atividade antioxidante dos extratos de casca de pinheiro. Testaram-se dois métodos de extração, nomeadamente Soxhlet e extração assistida por temperatura. A primeira realizou-se durante 4 horas em refluxo e a última foi realizada através da trituração de casca de pinheiro moída com um homogeneizador, sendo posteriormente agitada a 300 rpm durante 3 horas a 40 °C. Ambos os métodos de extração foram realizados com três solventes: água, bioetanol e 50% bioetanol aquoso. O tamanho de partícula da casca de pinheiro foi inferior a 200 µm em ambos os processos. O rendimento de extração foi determinado como a quantidade de extrato sólido recuperado em massa comparando com a quantidade inicial de casca seca. A atividade antioxidante foi determinada através do método de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). De modo geral, o método de Soxhlet apresentou um rendimento de extração e atividade antioxidante mais elevados ($34,97 \pm 0,20$ % m/m e $59,10 \pm 0,00$ µg eq. trolox/mL extrato, respetivamente) quando comparado com a extração assistida por temperatura ($31,78 \pm 0,06$ % m/m e $54,50 \pm 0,14$ µg eq. trolox/mL extrato, respetivamente) ($p < 0,05$). Relativamente ao solvente, em cada método, o bioetanol e 50% bioetanol aquoso apresentaram os melhores resultados ($p < 0,05$).

1. INTRODUÇÃO

O *Pinus pinaster* pode ser encontrado em alguns países da Europa Ocidental, como Portugal, Espanha, França, e em alguns países do Norte de África [1]. A casca de pinheiro é um resíduo abundante da indústria madeireira, uma vez que representa 10-20% do tronco do pinheiro [2]. Devido à sua grande disponibilidade à escala global, há um interesse acrescido no seu uso [3]. A casca de pinheiro apresenta várias vantagens, contém compostos fitoquímicos importantes, pode ser obtida a um preço baixo e possui estabilidade a longo prazo, o que em conjunto faz com que o seu uso seja de grande interesse [2, 4]. Algumas das atividades reportadas para os extratos de casca de pinheiro foram a atividade antioxidante, antimicrobiana, benefícios cardiovasculares e efeitos antidiabéticos, entre outros [1, 5]. Assim, os extratos de casca de pinheiro apresentam grande potencial para aplicação na indústria alimentar, uma vez que podem ser aplicados como antioxidantes para controlar a oxidação lipídica, por exemplo [6]. O objetivo deste estudo foi a determinação do efeito do método e do solvente de extração no rendimento do processo e da atividade antioxidante dos extratos de casca de pinheiro.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparação da amostra de casca de pinheiro

A casca de pinheiro (*Pinus pinaster* Aiton subsp. *atlantica*) foi recolhida na região do Minho de árvores com 15 anos de idade. A casca foi seca a 40 °C durante 72 horas para atingir um equilíbrio de humidade. Seguidamente moeu-se a casca num moinho de cereais e peneirou-se para seleccionar as partículas inferiores a 200 µm. A casca moída foi armazenada em sacos selados até utilização no estudo.

2.2 Extração por Soxhlet

Neste estudo, foi usado equipamento clássico de Soxhlet. Colocaram-se 12,5 g de casca de pinheiro moída num cartucho dentro da câmara de extração. Depois, adicionaram-se 220 mL de solvente (água, 50% bioetanol aquoso ou bioetanol) no balão de ebulição e a mistura refluxou durante 4 horas. A razão sólido/líquido foi de 1:17,6 (m/v). Houve necessidade de filtrar os extratos devido ao tamanho de partícula. Quando arrefecidos, os extratos foram aferidos a 250 mL com o respetivo solvente. Foram realizadas duas extrações por solvente.

2.3 Extração assistida por temperatura

Pesaram-se 12,5 g de casca de pinheiro, adicionaram-se 50 mL de solvente (água, 50% bioetanol aquoso ou bioetanol) e a amostra foi homogeneizada num Ultra-Turrax a 20.000 rpm, durante 1 min. Depois transferiu-se a mistura para um balão de 250 mL e adicionaram-se mais 50 mL de solvente. Os balões foram agitados num agitador orbital a 300 rpm durante 3 horas a 40 °C. Depois deste tempo, os balões foram armazenados durante 20 horas a 4 °C. As misturas homogêneas foram centrifugadas a 3.000 rpm durante 7 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi recolhido e filtrado a vácuo. Redissolveu-se o resíduo em solvente e centrifugou-se novamente. O novo sobrenadante foi recuperado e filtrado a vácuo. Os processos de redissolução, centrifugação e filtração foram repetidos uma terceira vez. Finalmente, o filtrado foi aferido a 250 mL e armazenado a 4 °C no escuro. Foram realizadas duas extrações por solvente.

2.4 Rendimento da extração

O rendimento da extração (em % m/m) é uma medida da eficácia do solvente para extrair componentes específicos do material de origem, definido como a quantidade de extrato sólido recuperado em massa comparado com a quantidade inicial de casca seca [5]. Este parâmetro foi determinado através da secagem de 25 mL de extrato a 103 °C para cada um dos solventes testados.

2.5 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada através do método de redução do radical livre DPPH usando o método descrito por Brand-Williams *et al.* [7]. Para cada extrato realizou-se uma série de diluições em metanol aquoso (80% v/v). Misturou-se 0,5 mL da amostra diluída com 4,0 mL de uma solução diluída de DPPH em metanol aquoso (80% v/v). Agitou-se no vortex

e colocou-se no escuro durante 1 hora. Leu-se a absorvância, num espectrofotómetro, a 515 nm usando o solvente metanol aquoso como branco. A solução controlo consistiu na solução de DPPH. A capacidade de redução do radical foi calculada pela eq. (1), onde A_s é a absorvância da amostra e A_c a absorvância do controlo. Preparou-se uma curva de calibração com uma solução padrão de Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) diluída em metanol 80% (40, 80, 100, 200, 280, 400 e 800 $\mu\text{mol/L}$). A percentagem de inibição do DPPH foi representada graficamente e determinada a concentração de antioxidante necessária para inibir 50% da concentração da solução de DPPH (EC_{50}). Os valores de EC_{50} foram expressos como mg eq. trolox/mL extrato.

$$\% \text{ inibição} = \left(1 - \frac{A_s}{A_c}\right) \times 100 \quad (1)$$

2.6 Análise estatística

As extrações e análises foram realizadas em duplicado e os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. O software SPSS (IBM, USA) foi usado para a realização da análise estatística. A análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foram usados para determinar os valores significativamente diferentes a um nível de significância de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

São vários os fatores que influenciam os resultados da extração, como por exemplo o método de extração, solvente selecionado, preparação da amostra (tamanho da partícula e condições de secagem), razão sólido-líquido, temperatura e o tempo de contacto entre a amostra e o solvente [6]. A Tabela 1 apresenta o rendimento de extração e a atividade antioxidante para ambos os métodos de extração. De uma forma geral, a extração por Soxhlet obteve melhores resultados quando comparada à extração assistida por temperatura. Relativamente ao efeito do solvente, as extrações com 50% bioetanol aquoso e bioetanol pelo método de Soxhlet e a extração com bioetanol pelo método de extração assistida por temperatura não mostraram diferenças significativas entre si ($34,21 \pm 1,90$, $34,97 \pm 0,20$ e $31,78 \pm 0,06$ % m/m, respetivamente) ($p > 0,05$). Estas combinações de método e solvente apresentaram o maior rendimento de extração. Seguiram-se os extratos da extração assistida por temperatura com 50% bioetanol aquoso e extração com água pelo método de Soxhlet que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si ($22,79 \pm 0,98$ e $19,57 \pm 1,04$ % m/m, respetivamente) ($p > 0,05$). A extração assistida por temperatura com água foi a que obteve um rendimento mais baixo ($12,42 \pm 0,47$ % m/m). No que concerne a atividade antioxidante, o extrato aquoso do método de extração assistida por temperatura apresentou diferenças estatisticamente significativas dos extratos 50% bioetanol aquoso e bioetanólico do método de Soxhlet, sendo o primeiro o extrato com menor atividade antioxidante e os últimos, os extratos com maior atividade antioxidante ($45,20 \pm 0,71$, $58,65 \pm 4,45$ e $59,10 \pm 0,00$ μg eq. trolox/mL extrato, respetivamente) ($p < 0,05$). Os restantes extratos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nem entre si, nem entre os acima citados ($p > 0,05$).

Tabela 1. Rendimento de extração e atividade antioxidante para ambos os métodos de extração.

| Método | Solvente | Rendimento da extração (% m/m) | Atividade antioxidante ($\mu\text{g eq. trolox/mL extrato}$) |
|------------------------------------|----------------------|-----------------------------------|---|
| Soxhlet | Água | $19,57 \pm 1,04^a$ | $52,35 \pm 3,75^{ab}$ |
| | 50% Bioetanol aquoso | $34,21 \pm 1,90^b$ | $58,65 \pm 4,45^a$ |
| | Bioetanol | $34,97 \pm 0,20^b$ | $59,10 \pm 0,00^a$ |
| Extração assistida por temperatura | Água | $12,42 \pm 0,47^c$ | $45,20 \pm 0,71^b$ |
| | 50% Bioetanol aquoso | $22,79 \pm 0,98^a$ | $54,50 \pm 0,14^{ab}$ |
| | Bioetanol | $31,78 \pm 0,06^b$ | $50,70 \pm 1,84^{ab}$ |

Médias na mesma coluna com letras sobrescritas são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

4. CONCLUSÕES

O método de extração por Soxhlet apresentou, de forma geral, melhor rendimento de extração e atividade antioxidante. No que concerne ao efeito do solvente, 50% bioetanol aquoso e bioetanol apresentaram resultados semelhantes ($p > 0,05$).

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto SUDOE Redvalue SOE1/P1/E0123.

Referências

- [1] L Chupin, SL Maunu, S Reynaud, A Pizzi, B Charrier, et al., Industrial Crops and Products 2015, 65, 142-149.
- [2] IJ Seabra, AMA Dias, MEM Braga, and HC de Sousa, The Journal of Supercritical Fluids 2012, 62, 135-148.
- [3] A Ronda, M Della Zassa, A Biasin, MA Martin-Lara, and P Canu, Fuel 2017, 193, 81-94.
- [4] MEM Braga, RMS Santos, IJ Seabra, R Facanali, MOM Marques, et al., The Journal of Supercritical Fluids 2008, 47, 37-48.
- [5] E Aspé, K Fernandez, Industrial Crops and Products 2011, 34, 838-844.
- [6] T Belwal, SM Ezzat, L Rastrelli, ID Bhatt, M Daglia, et al., Trends in Analytical Chemistry 2018, 100, 82-102.
- [7] W Brand-Williams, ME Cuvelier, and C Berset, LWT - Food Science and Technology 1995, 28, 25-30.

Sucessos e insucessos na cooperação entre indústria e ciência

Contributo para a implementação da Norma BRC Food numa indústria de carnes

Madalena Correia¹, Alberta Araújo^{1,2,*}

¹ESTG – Instituto Politécnico de Viana do Castelo, 4900-348 Viana do Castelo, Portugal

²CEB – Centre of Biological Engineering, University of Minho, 4710-057 Braga, Portugal

*e-mail: alberta@estg.ipvc.pt

Palavras chave: Sistema de gestão da Qualidade; BRC Food, não conformidades

RESUMO

Atualmente, à indústria alimentar é exigida a produção de produtos com elevada qualidade e a baixo custo, ou seja, que cumpram os requisitos e especificações aplicáveis. De modo a gerir e melhorar de forma contínua os procedimentos e processos, as empresas têm optado por implementar sistemas globais de gestão de qualidade, tais como a *BRC Food*. Esta norma é globalmente reconhecida por vários retalhistas, empresas alimentares e produtores. Assim, com o intuito de melhorar o sistema de gestão da qualidade e com vista a atingir novos mercados de comercialização, a empresa propôs-se a implementar a BRC Food versão 7. Este sistema da qualidade providencia uma estrutura para gerir a segurança, qualidade, integridade e legalidade dos produtos alimentares. A atividade desta empresa centra-se na comercialização de carne de suíno, em carcaça ou desmanchada, carne de bovino, como picanhas, alcatras, lombo e carne de caprino, ovino e aves. A empresa não possui nenhuma certificação, estando apenas implementado o sistema HACCP e o respetivo Programa de Pré-Requisitos. Inicialmente realizou-se uma auditoria diagnóstica, onde foram identificadas várias não conformidades, de onde foi elaborado um plano de trabalhos e de obras. Na elaboração dos fluxogramas foram considerados 2 pontos críticos de controlo 1 e 2, o acondicionamento a vácuo e o detetor de metais e os respetivos controlos. A implementação dos documentos permitiu consolidar as práticas já realizadas na empresa, tendo sido realizada recentemente uma auditoria final ao sistema global, de onde resultou a respetiva certificação com classificação B e 14 não conformidades menores. Após implementação, verificou-se que a empresa tem um controlo mais eficiente dos riscos para a segurança alimentar, proporcionou melhorias na documentação, incorporou os Programas de Pré-Requisitos no sistema de gestão da empresa, permitiu uma comunicação organizada e eficaz com as partes interessadas e prevê-se uma redução dos custos de possíveis erros na cadeia de produção.

1. INTRODUÇÃO

Na indústria alimentar, o requisito qualidade é muito importante para a aceitação por parte do consumidor. De um modo geral, qualidade significa a produção e o produto final encontrarem-se em conformidade com requisitos e especificações aplicáveis. Os consumidores esperam obter produtos de qualidade, com um valor de mercado aceitável e que sejam seguros, o que fez com que a legislação da gestão da indústria alimentar tenha aumentado consideravelmente.

A BRC é uma norma internacional desenvolvida e publicada no ano de 1998, encontrando-se atualmente na versão 7, estando em 2018 previsto a atualização da norma para a versão 8 [1]. Foi criada para satisfazer as exigências dos retalhistas de produtos alimentares, uniformizando os requisitos de qualidade e segurança alimentar, cumprir a legislação e satisfazer os consumidores de mercados externos. A certificação pela BRC é reconhecida mundialmente por vários retalhistas, empresas alimentares e produtores. É especialmente adotada por empresas que abastecem o mercado britânico, sendo que atualmente 115 empresas portuguesas encontram-se certificadas por esta norma. Este sistema da qualidade providencia uma estrutura para gerir a segurança, qualidade, integridade e legalidade dos produtos alimentares, assim como o controlo de operações para atingir esses objetivos. É internacionalmente reconhecida pela GFSI. A BRC incide na importância do compromisso da gestão; no HACCP baseado em programas de segurança alimentar; em sistemas de gestão da qualidade; no desenvolvimento de sistemas que minimizem a exposição à fraude alimentar; na auditoria de processos de fabrico; na auditoria de áreas como rotulagem e embalamento; em garantir a consistência no processo auditoria; no incremento de uma maior resiliência, e na transparência e rastreabilidade na cadeia alimentar. A certificação por normas internacionais, como a *BRC Food*, permite demonstrar uma elevada competência em termos de sistema HACCP, no sistema de qualidade, através da minimização dos riscos alimentares de segurança alimentar, estimulando ainda o controlo dos processos internos. Permite ainda atender às exigências e expectativas dos clientes, pelo cumprimento dos planos e sistemas exigidos pela norma [2].

2. IMPLEMENTAÇÃO DA NORMA BRC FOOD VERSÃO 7 NA EMPRESA

Na fase inicial foi necessário realizar uma auditoria a todo o sistema com base nos requisitos da norma BRC Food versão 7, de forma a averiguar as não conformidades existentes e elaborar um plano de trabalho, de acordo com os resultados obtidos. De modo a implementar o referencial BRC Food, foram utilizados os resultados da auditoria inicial, para planificar todo o processo. Foram criados documentos, como Procedimentos, Impressos, Códigos de Conduta, Fichas Técnicas de Produto e rever todo o sistema HACCP já implementado.

Os principais requisitos para a certificação pela BRC são:

- 1- Compromisso pela Gestão de Topo;
- 2- Plano de Segurança Alimentar - HACCP;
- 3- Sistema de Segurança Alimentar e Gestão da Qualidade;
- 4- Requisitos relativos à Instalação;
- 5- Controlo do produto;
- 6- Controlo do processo;
- 7- Pessoal.

O desenvolvimento do trabalho iniciou-se pela redação do procedimento onde são descritas as regras para a criação dos restantes documentos. Neste procedimento, denominado P.01 definiu-se o formato dos documentos, as responsabilidades e autoridades e as regras de criação de documentos. Foram redigidos vários procedimentos, nomeadamente o P.01 – Controlo de

Documentos; P.02 – gestão e melhoria; P.04 gestão das não conformidades, ações corretivas e ações preventivas; P.05 – compras; P.06 gestão da segurança alimentar; P.08 – produção e logística; P.09 autenticidade do produto; P.12 – controlo de corpos estranhos (quebráveis); P.13 – Food Defense; entre outros. Criaram-se ainda impressos que tiveram origem nos procedimentos. Na admissão de novos colaboradores passou a ser ministrada uma ação de formação onde são apresentados o código de Conduta e o Manual de Acolhimento. Nas instalações foram ainda efetuadas obras para responder aos requisitos da norma, como criação de novos balneários, zona de lanche para os colaboradores, colocação de aço inoxidável nas junções das paredes. Na totalidade foram redigidos 14 procedimentos, vários registos, 3 manuais, um código de conduta, entre outros documentos

Para cumprir as exigências do requisito 2 referente ao Plano de Segurança Alimentar foi redigido um Procedimento P.06 – Gestão da Segurança Alimentar. Neste documento definiu-se a metodologia de elaboração de um plano HACCP, que se traduz numa série de etapas preliminares, na aplicação dos sete princípios do HACCP e na avaliação do sistema HACCP. É um plano de segurança totalmente implementado e um plano de segurança eficaz com base nos princípios de HACCP do *Codex Alimentarius*. O plano HACCP é documentado no PMM - Plano de Monitorização e Medição e HACCP, que inclui toda a informação, para cada ponto crítico de controlo. Para todas as etapas que são importantes à segurança de alimentos, mas que não são PCC's, são implementados e documentados pontos de controlo (PC's) e medidas de controlo apropriadas, que estão incluídos também no PMM - Plano de Monitorização e Medição e HACCP (tabela 2) O fluxograma elaborado é composto por 22 etapas, sendo que as etapas 7 e 8 correspondem aos pontos críticos de controlo 1 e 2, o acondicionamento a vácuo e o detetor de metais, respetivamente, conforme consta na tabela 1.

Tabela 1 – Descrição dos PCC das etapas 7 e 8 do Fluxograma de processo.

| ETAPA | DESCRIÇÃO DAS ETAPAS |
|--|--|
| 7 – Acondicionamento em vácuo PCC nº 1 | O operador responsável procede à colocação do produto dentro de sacos plásticos específicos para o embalamento a vácuo. As embalagens são colocadas no equipamento de vácuo, sendo controlado aspetos do produto (aderência do saco e estanquicidade) e parâmetros da máquina (pressão, tempo de soldadura e estado da barra de soldadura). Os controlos são efetuados de acordo com os requisitos descritos no P.08. |
| 8 – Detetor de metais PCC nº 2 | Antes da etiquetagem, as peças em vácuo e acondicionadas a granel (saco) passam através de um tapete automático no equipamento detetor de metais. Os controlos são efetuados de acordo com os requisitos estabelecidos |

Tabela 2 – Plano de monitorização e medição HACCP para os PCCs 1 e 2.

| Etapa | PERIGO / MEDIDA DE CONTROLO | Limite Especificado Limite crítico | Monitorização e Medição | | | | | Ações a tomar em caso de desvio PCC's ou Não conformidade | | | |
|--|---|---------------------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------|--|------------------|---|---|---|---|
| | | | Método | Equipamento | Frequência | Amostra | Responsabilidade | Registo e Verificação | Correção / | Corretiva | |
| Detectores Metálicos PCC n.º 2 | Produto Acabado Perigo: risco (presença de metais acima dos padrões) | Deteção Ferrosos | Xx,mm | Verificação | Padrões certificados | Arranque produção (teste do padrão – programa default) + Ao longo do dia (teste do padrão com o produto – vários programas) | 1 amostra | Qualidade e Segurança Alimentar | Registo de Verificação do detector de Metais (P.06.07) | Caso não se detecte algum dos padrões, suspender a produção e informar imediatamente o Resp. Produção ou Qualidade e Segurança Alimentar Caso uma amostra seja não-conforme, passar 3x no detector e rejeitar se se confirmar não-conforme | Plano de Manutenção Preventiva. Formação dos operadores para atenção no funcionamento dos detectores de metais. Análise de causas procedendo de acordo com o P.04 |
| | | Deteção Não-ferrosos | Xx,mm | | | | | | | | |
| | | Deteção Inox | Xx,mm | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| Acondicionamento em vácuo PCC N.º 1 | Parâmetros da máquina do vácuo | Pressão | 94 | Leitura | Visor máquina | Arranque, durante produção e fim de produção | 1 unidade | Qualidade e Segurança Alimentar | Controlo de Produção, Embalamento / Etiquetagem (P.06.09) | Sempre que houver algum desvio, avaliar: 1. se algum dos parâmetros da máquina não cumprirem o especificado, repor os parâmetros, e avaliar a conformidade do produto desde o último controlo. 2. se for detectado alguma perda de vácuo informar Resp. Produção e Resp. Qualidade e Segurança Alimentar e avaliar: - dos operadores, - frequência de ocorrência ao longo do período de trabalho, - proceder ao da peça em questão, passando por todas as fases. | Cumprimento Plano de Manutenção Preventiva. Formação dos operadores para operar vácuo. Análise de causas procedendo de acordo com o P.04] |
| | | Tempo de soldadura | 1,8 segundos | Leitura | Visor máquina | | | | | | |
| | Produto | Barra de soldadura | Estado de conservação | Verificação visual | Não aplicável | | | | | | |
| | | Aderência do saco | Peça com aderência total | Verificação visual e tacto | Não aplicável | | | | | | |
| | | Estanquicidade | Saco bem fechado | | Não aplicável | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |

Elaborado: EQSA/FD

Aprovado: Administração

P.06.02 (V1.0)

3. CONCLUSÃO

De um modo geral, foi possível cumprir maioritariamente as exigências da norma internacional. A auditoria de certificação realizada em outubro permitiu obter a certificação com classificação B e 14 não conformidades menores. A implementação da Norma ajudou ainda ao desenvolvimento interno através da melhoria contínua do sistema de qualidade. A concretização da certificação nesta norma proporcionará à empresa prestígio e ajudará a abrir novos mercados, um dos objetivos da Administração. A empresa possui, agora, um maior controlo do seu sistema de produção e assegura a distribuição de produtos legais e seguros.

REFERÊNCIAS

- [1] “BRC Global Standards,” BRC GLOBAL STANDARD FOR FOOD SAFETY ISSUE 8 [Online]. Available: <https://www.brcglobalstandards.com/brc-global-standards/food-safety/food-safety-issue-8/>. [Acedido em 09 04 2018].
- [2] BRC Global Standards, “Global Standard Food Safety Issue 7,” 2015.

Otimização da gestão de silos de um processo produtivo de massas alimentícias bicolores, tricolores ou quadricolores secas

Catarina Magalhães¹, Susana Fonseca^{1,2} and Alberta Araújo^{1,3}*

¹ESTG – Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Viana do Castelo, Portugal

²UP – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, Portugal

³CEB – Centre of Biological Engineering, University of Minho, 4710-057 Braga, Portugal
e-mail: alberta@estg.ipvc.pt

Palavras chave: massas secas, matriz de decisão, otimização da produção

RESUMO

O objetivo deste trabalho de mestrado em Empreendedorismo e Inovação na Indústria Alimentar, foi a otimização da gestão de 60 silos no processo produtivo de massas secas numa indústria produtora de massas secas, entre as etapas de fabrico e de embalagem (ensilagem) e otimização da produção de massas secas bicolores, tricolores ou quadricolores, tendo em conta o número de silos disponíveis e as linhas de embalagem. Esta unidade industrial dispõe de 60 silos, todos com a mesma dimensão para armazenamento da massa, distribuídos em 4 baterias ou filas, cada uma delas com 15 silos.

A boa gestão de silos depende de diversos fatores e é uma tarefa de responsabilidade e difícil, esta situação agrava-se com a produção das massas bicolores, tricolores ou quadricolores, designadas de especialidades. A produção destes produtos requer especial atenção, uma vez que a fábrica dispõe de 60 silos de massas cortadas e a produção destas massas implica silos ocupados, que só poderão começar a esvaziar quando estiverem todas as cores em silo. Assim sendo, é importante definir os lotes mínimos de produção de massas com mais do que uma cor, para que se possa otimizar as produções e reduzir os desperdícios, sem afetar a quantidade de silos disponíveis ao normal funcionamento das linhas de embalagem. A matriz de decisão foi elaborada com base em dados atualizados e tendo em conta essencialmente os peneiros e as linhas de embalagem, para o qual a massa deve ser encaminhada. Assim, consegue-se um trajeto fluente dos produtos, sem desperdícios e um normal funcionamento das linhas de fabrico e embalagem, reduzindo os desperdícios. Conclui-se ainda que com recurso a um planeamento adequado, produção de massas com mais do que uma cor com quantidades máximas e mínimas definidas e com recurso à matriz de decisão, não é necessário a aquisição de novos tapetes ou peneiros.

1. INTRODUÇÃO

A indústria produtora de massas secas onde o trabalho foi realizado, produz muitas variedades e especialidades de massas cortadas, compridas e enroladas.

Para a produção de massas cortadas, a fábrica dispõe de duas linhas de fabrico (linha A e linha B), figura 1, que alimentam 4 linhas de embalagem (linha 1, linha 2, linha 3 e linha 4). As linhas de fabrico trabalham em contínuo 24 horas por dia e cada ciclo de produção dura cerca de 5 horas, ou seja, desde o momento em que a massa começa a ser produzida, até começar a entrar em silo, passam cerca de 5 horas em ambas as linhas.

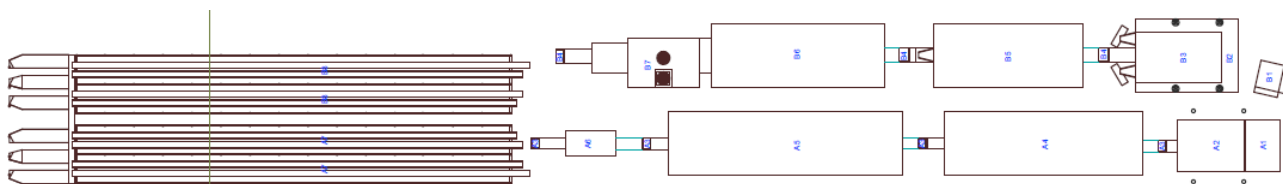


Figura 1 - Layout das linhas de fabrico A e B e dos silos.

As linhas de embalagem têm também um modo de funcionamento semelhante entre elas. Dos peneiros, a massa é encaminhada para um tapete até às balanças. As linhas 1, 2 e 3 têm balanças multicabeçais e a linha 4 são copos doseadores. Uma vez produzida, a massa vai para silos, para depois ser embalada. Entre a etapa de fabrico e de embalagem existe a ensilagem. Esta unidade industrial dispõe de 60 silos para armazenamento da massa, dispostos em 4 baterias ou filas, cada uma delas com 15 silos.

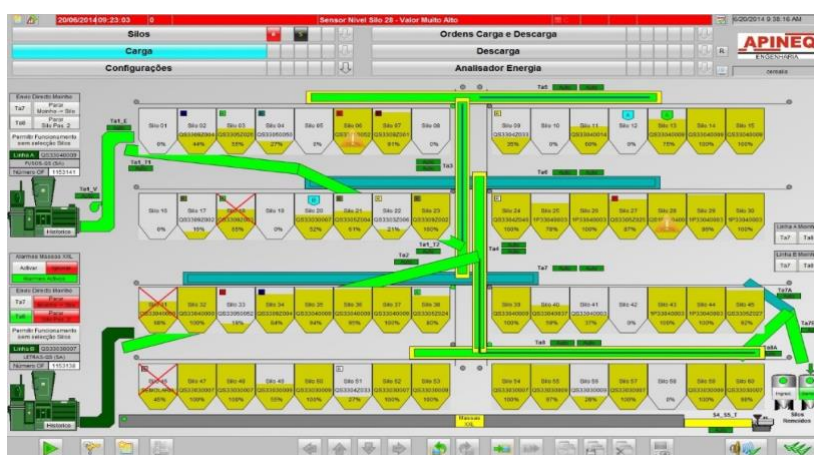


Figura 2 - Disposição dos silos.

Os silos têm todos a mesma dimensão, e a capacidade deles depende essencialmente da densidade e formato do produto. A decisão de quais as referências a colocar em cada silo, é da responsabilidade conjunta dos chefes de turno do fabrico e embalagem e é uma problemática da empresa, uma vez que uma decisão errada, pode implicar desperdício de pessoas, tempo, equipamentos e até mesmo produto. Uma má gestão de silos representa um problema significativo para a empresa, no sentido em que, pode implicar a paragem das linhas de fabrico, ou seja, um desperdício energético no esvaziamento da linha e um ciclo de 5 horas para nova produção de massas cortadas. Outra situação relevante, consequente de uma má gestão de silos, é a possibilidade de gerar produto não conforme, devido à paragem forçada das linhas de fabrico, deixando massa dentro da máquina mais tempo do que o esperado. Qualquer uma destas situações tem impacto no embalagem, sendo que, podem estar todos os silos cheios e não ser possível embalar a massa por indisponibilidade de tapetes que levem a massa até ao embalagem e desta forma tanto os recursos humanos como as máquinas encontram-se paradas em tempo útil. Este trabalho, resultou da necessidade de desenvolver uma ferramenta de apoio à tomada de decisão da produção para a gestão de 60 silos entre o fabrico e o embalagem de massas cortadas, tendo em conta a disponibilidade de silos, tapetes e a linhas de embalagem [1,2].

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MASSAS TRICOLORS

Para uma gestão de silos eficiente é necessário definir qual a quantidade máxima de massas com mais do que uma cor a produzir de cada vez, para por um lado minimizar os desperdícios de produto na mudança de cor, mas por outro não colocar em risco, a gestão dos silos. A produção destes produtos requer especial atenção, uma vez que a fábrica dispõe de 60 silos de massas cortadas e a produção destas massas implica silos ocupados, que só poderão começar a esvaziar quando estiverem todas as cores em silo. É expectável que haja ainda massa em silo para as quatro linhas de embalagem, até ao momento que se inicie o embalagem de massas multicolores. Nas regras de planeamento está estipulado que, para cada produção de massas com mais do que uma cor não devem ser ultrapassados os 15 silos, ou seja, 1 bateria. Assim sendo, é importante definir os lotes mínimos de produção de massas com mais do que uma cor, para que se possa otimizar as produções e reduzir os desperdícios, sem afetar a quantidade de silos disponíveis ao normal funcionamento das linhas de embalagem. A Tabela 1 menciona a quantidade total a produzir e a quantidade total a embalar tendo em conta todos os pressupostos, como a quantidade de cores, a quantidade de silos para cada cor e a capacidade de cada silo. A mudança de cores origina um desperdício elevado que é o mesmo quer se produza 20 kg ou 200 kg, e como tal é fundamental ter lotes de produção otimizadas ao máximo de acordo com a disponibilidade dos silos. Os lotes mínimos de produção é mais uma ferramenta de apoio ao planeamento, em que é indicada a quantidade máxima de produção dos produtos com mais do que uma cor, tendo em conta os desperdícios, mas também tendo em conta uma boa gestão dos silos.

Tabela 1 Quantidade dos lotes mínimos de produção de massas com duas ou mais cores

| Produto | Bagos Tricolor | Conchas Tricolor | Espiraís Tricolor | Espiraís Tricolor | Espiraís Tricolor | Estrelas Tricolor | Laços Tricolor | Margaridas | Mini Laços | Laços Bicolor |
|---------------------------------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------|------------|------------|---------------|
| Linha de fabrico | B | B | A | A | A | B | B | B | B | B |
| Molde de fabrico | 829 | 722 | 951/22 | 766 | 765 | 806 | 596 | 596 | 596 | 596 |
| Capacidade nominal linha (kg/h) | 1500 | 1500 | 1700 | 1700 | 1700 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 | 1500 |
| Capacidade real/ formato (kg/h) | 1175 | 1275 | 1435 | 1020 | 1435 | 1170 | 855 | 686 | 850 | 855 |
| Tempo enchimento silo (min) | 120 | 70 | 35 | 50 | 40 | 110 | 85 | 80 | 110 | 85 |
| Capacidade silo (kg) | 2350 | 1488 | 873 | 850 | 957 | 2145 | 1211 | 915 | 1558 | 1211 |
| Nº de cores | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 | 2 | 2 |
| Silos/ cor | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 8 | 8 |
| Desperdício médio/ cor (kg) | 100 | 200 | 200 | 250 | 200 | 100 | 200 | 150 | 150 | 200 |
| Quantidade total produzir (kg) | 35550 | 22920 | 13695 | 13500 | 14955 | 32475 | 18765 | 15240 | 25228 | 19776 |
| Quantidade total a embalar (kg) | 35250 | 22320 | 13095 | 12750 | 14355 | 32175 | 18165 | 14640 | 24928 | 19376 |

Pela análise da Tabela 1 constata-se que as produções de massas com duas ou mais cores, implica um grande desperdício. Este desperdício ocorre essencialmente na mudança de cor no fabrico, que no mínimo é de 100 kg e vai até 250 kg, dependendo do molde. Estas quantidades são fixas independentemente da quantidade de cada cor produzida e a forma de reduzir o

desperdício é aumentar os lotes de produção de tricolores, até ao limite de 15 silos estipulados para o efeito.

2.2. MATRIZ DE DECISÃO DE APOIO À GESTÃO DE SILOS

A Matriz de Decisão apresentada na Tabela 2 relaciona as referências, com os moldes de fabrico e com as linhas de embalagem preferencial e alternativa, caso exista. As cores indicam quais as consequências de colocar a massa em qualquer uma das baterias de silos. O verde refere-se ao embalagem direto, ou seja, não é necessário recorrer a nenhum dos dois tapetes transversais para a colocação da massa no respetivo peneiro. O amarelo indica que para embalar um determinado produto daquela bateria para aquela linha de embalagem é necessária a utilização do tapete pequeno. O laranja refere-se à utilização do tapete grande e o roxo à utilização de um tapete específico para o embalagem de massas XXL, que é colocado diretamente à saída da linha de produção, não passando as massas pelo processo de ensilagem.

Tabela 2 - Matriz de decisão de apoio à gestão de silos

| | ALETRIA FQ - 504 | | NA01040203 | | NA01040256 | | ARGOLINHAS - 600 | | NA01030011 | | NA01030057 | | BAGOS - 829 | | FI01030014 | | MZ01030029 | | PG01030039 | | AM01030039 | | BAGOS TRICOLOR - 829 | | MZ01050113 | | MZ01090008 | | BUZIOS - 740 | | NA01040258 | | NA01040251 | | BUZIOS INTEGRAIS - 740 | | MZ01050114 | | CONCHAS - 722 | | MZ01040151 | | MZ01040126 | | MZ01040196 | | MZ01040172 | | CONCHAS GIGANTES - 957 | | MZ01040105 | | CONCHAS TRICOLOR - 722 | | MZ01050126 | | MZ01050141 | | MZ01050108 | | DIO1050028 | | COTOVEL FINOS - 699 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|------------------|---|------------|--|------------|---|------------------|--|------------|---|------------|---|-------------|--|------------|---|------------|--|------------|---|------------|--|----------------------|---|------------|--|------------|---|--------------|---|------------|--|------------|--|------------------------|--|------------|--|---------------|--|------------|--|------------|--|------------|--|------------|--|------------------------|--|------------|--|------------------------|--|------------|--|------------|--|------------|--|------------|--|---------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|----|
| L. Preferencial | | 3 | 3 | | | 2 | 2 | | | 4 | 4 | 4 | 4 | | | 1 | 1 | | | 3 | 3 | | | 1 | | | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | </ |

3. CONCLUSÕES

Conclui-se que com recurso a um planeamento adequado, produção de massas com mais do que uma cor com quantidades máximas e mínimas definidas e com recurso à matriz de decisão, não é necessário a aquisição de novos tapetes ou peneiros. Foi elaborada uma matriz de decisão, simples e objetiva que disponibiliza informação ao agente de decisão, para que seja tomada a decisão ótima. Trabalhar de forma antecipada e prever onde vai ser colocado o produto, em que linha vai ser embalado e quanto tempo demora este processo, quantos silos vão encher e quanto tempo demoram a esvaziar, é fundamental para trabalhar com o mínimo de desperdícios possível. Assim, consegue-se um trajeto fluente dos produtos, sem desperdícios e um normal funcionamento das linhas de fabrico e embalagem, reduzindo os desperdícios.

REFERÊNCIAS

- [1] Goreti Marreiros. Journal of Operations Management, 2004, 17,558 – 575.
- [2] Shah, R. and Ward, P. Journal of Operations Management, 2007, 25, 785-805

CIÊNCIA E INOVAÇÃO

Avanços no processamento de alimentos e impacto na saúde e sociedade

Questões relevantes em torno da embalagem e rotulagem

Desafios na valorização produtos tradicionais

Qualidade e segurança de alimentos

Novas funcionalidades alimentares

Nutrição, saúde e tecnologia de alimentos

Alimentos processados: avaliação da conformidade da rotulagem

Tânia Gonçalves Albuquerque^{a,b,*}, M. Antónia Nunes^b, M. Beatriz P.P. Oliveira^b, Helena S. Costa^{a,b}

^a Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P., Lisboa, Portugal

^b REQUIMTE, LAQV/Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal

*tania.g.alb@gmail.com

Palavras chave: alimentos processados; rotulagem; declaração nutricional

RESUMO

A rotulagem dos alimentos é crucial para o consumidor fazer, caso queira, uma escolha informada e consciente dos produtos alimentares que adquire. Com a entrada em vigor do Regulamento (UE) n.º 1169/2011, foram estabelecidas regras, aplicáveis a todos os Estados-Membros, relativamente à rotulagem dos géneros alimentícios. No entanto, podem existir, desvios entre os valores dos nutrientes declarados na informação nutricional e os presentes no alimento. Em 2012, para ultrapassar esta situação, foram fixadas as tolerâncias aplicáveis aos valores declarados no rótulo.

O objetivo deste trabalho foi verificar a conformidade da rotulagem de 10 categorias de alimentos processados (*snacks*, *fast-food*, frutos secos e sementes oleaginosas, refeições prontas-a-comer, cereais, molhos, sopas, produtos de pastelaria, produtos de panificação, batatas fritas e outros produtos à base de batata) amplamente disponíveis no mercado nacional e internacional.

Foram incluídos 209 alimentos recolhidos em grandes superfícies e restaurantes de fast-food. Determinaram-se os teores de sal, gordura total e ácidos gordos, pelos métodos de Charpentier-Volhard, hidrólise ácida com extração em Soxhlet e cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama, respetivamente. Foram aplicadas as tolerâncias de acordo com a legislação em vigor, utilizando os valores declarados no rótulo das embalagens.

Apenas 50% das amostras analisadas estavam dentro dos limites de tolerância para o teor de sal. O menor número de amostras fora dos limites de tolerância foi observado para a gordura. Para os ácidos gordos saturados, 26% das amostras estavam fora dos limites de tolerância. A categoria dos cereais foi a única em que 100% dos produtos estavam em conformidade para os teores de gordura e sal.

Conclui-se, assim, ser de extrema importância que a indústria alimentar atualize continuamente os valores declarados nos rótulos, pois essa informação é crucial para os consumidores e para a elaboração de políticas alimentares. As maiores diferenças foram encontradas nas categorias *snacks* e *fast-food*. Os resultados apresentados podem ser importantes não só para os consumidores, mas também para organizações de saúde pública e indústria alimentar.

1. INTRODUÇÃO

A rotulagem dos alimentos é crucial para o consumidor fazer, caso queira, uma escolha informada e consciente dos produtos alimentares que adquire. Com a entrada em vigor do Regulamento (UE) n.º 1169/2011 de 25 de outubro, foram estabelecidas regras, aplicáveis a todos os Estados-Membros, relativamente à rotulagem dos géneros alimentícios [1]. Em 13 de dezembro de 2016, passou a ser obrigatória a inclusão da declaração nutricional nos rótulos

dos alimentos pré-embalados, nomeadamente os seguintes parâmetros: valor energético, lípidos, ácidos gordos saturados, hidratos de carbono, açúcares, proteínas e sal. Esta medida legislativa pretende estabelecer definições, princípios, requisitos e procedimentos comuns, a fim de criar um enquadramento claro e uma base comum para as medidas da União e nacionais, em matéria de informação sobre os géneros alimentícios. Para além disso, outro dos grandes objetivos desta legislação é garantir o direito dos consumidores à informação, assegurando que esta é adequada, permitindo fazer uma escolha consciente sobre os alimentos que consomem.

No entanto, existem por vezes desvios entre os valores dos nutrientes declarados na informação nutricional e os presentes no alimento. Em 2012, para ultrapassar esta situação, foram fixadas as tolerâncias aplicáveis aos valores de nutrientes declarados no rótulo. De acordo com Documento de Orientação Destinado às Autoridades Competentes para o controlo, no que diz respeito à fixação das tolerâncias aplicáveis aos valores de nutrientes, consideram-se tolerâncias: *as diferenças aceitáveis entre os valores dos nutrientes declarados num rótulo e os determinados durante os controlos oficiais, no que se refere à «declaração nutricional» ou «rotulagem nutricional» descritas no Regulamento (UE) n.º 1169/2011* [2]. Estas diferenças podem ser devidas a vários fatores, nomeadamente a fonte dos valores (valores extraídos da literatura, calculados por receita e não por análise), o rigor de análise, a variação das matérias-primas, o efeito da transformação, a estabilidade dos nutrientes e as condições e o tempo de armazenamento [2].

O objetivo deste trabalho foi verificar a conformidade da rotulagem de 10 categorias de alimentos processados (snacks, *fast-food*, frutos secos e sementes oleaginosas, refeições prontas-a-comer, cereais, molhos, sopas, produtos de pastelaria, produtos de panificação, batatas fritas e outros produtos à base de batata) amplamente disponíveis no mercado nacional e internacional.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Entre 2015 e 2016, foram adquiridos 209 produtos alimentares pré-embalados, disponíveis em Portugal, em supermercados, hipermercados, restaurantes *fast-food* e serviços de *take-away*. Sempre que possível, foram adquiridos alimentos de diferentes marcas e produtores. Após a receção dos alimentos no laboratório, foi preenchido um formulário Excel® contendo as seguintes informações: (i) identificação e descrição dos alimentos; (ii) local, data e hora da recolha; (iii) lista de ingredientes; e (iv) declaração nutricional. Determinaram-se os teores de sal, gordura total e ácidos gordos, pelos métodos de *Charpentier-Volhard*, hidrólise ácida com extração em *Soxhlet* e cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama, respetivamente [3-5]. Foram aplicadas as tolerâncias de acordo com a legislação em vigor, utilizando os valores declarados no rótulo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os limites de tolerância fixados pela União Europeia variam de acordo com o tipo de nutriente, mas também com a sua concentração. Para o teor de sal, os limites de tolerância são $\pm 0,375$ g, se o alimento tiver um teor $<1,25$ g/100 g, e $\pm 20\%$ se o alimento tiver um teor de sal $\geq 1,25$ g/100 g [2]. Por sua vez, para a gordura total há três intervalos: para um alimento com um teor de gordura inferior a 10 g/100 g, o limite de tolerância é de ± 2 g, enquanto que para alimentos com um teor de gordura de 10-40 g/100 g ou >40 g/100 g é de $\pm 20\%$ ou ± 8 g, respetivamente [2].

Para os nutrientes selecionados (Figura 1), e para os quais foi possível realizar a avaliação da conformidade com os limites de tolerância da União Europeia, a gordura foi o que apresentou maior percentagem de alimentos (88%) com valores conformes, quando comparada com o sal (75%) e os ácidos gordos saturados (74%).

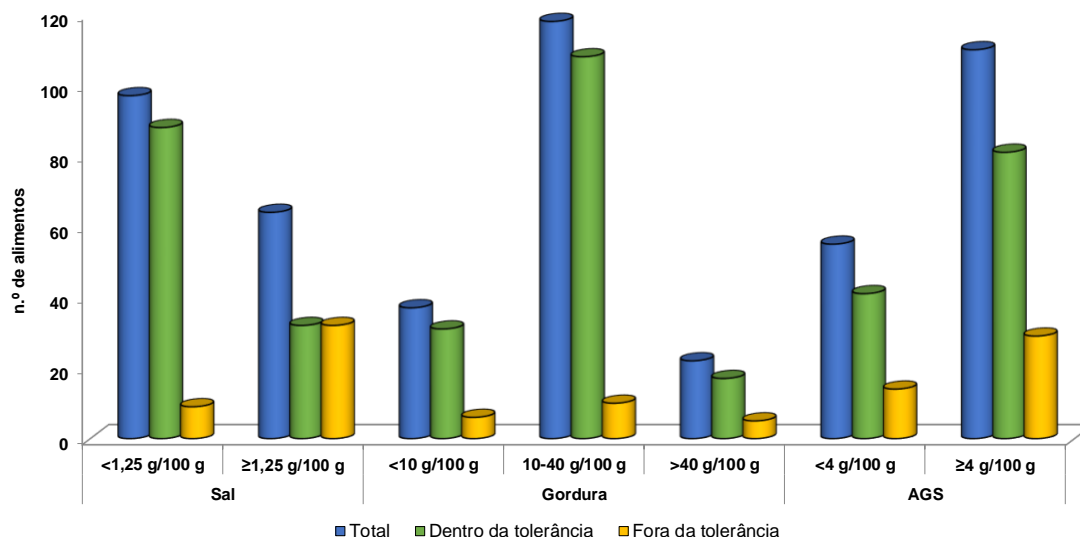


Figura 1. Alimentos processados pré-embalados para os quais os valores declarados para o sal, gordura e ácidos gordos saturados (AGS) estão dentro ou fora dos limites de tolerância da UE.

No que diz respeito aos valores declarados de sal, 25% dos produtos selecionados não estavam em conformidade com os limites de tolerância. Os alimentos com um teor de sal $\geq 1,25$ g/100 g foram os que tiveram maior número de alimentos (32 de 64 alimentos) fora dos limites de tolerância.

O limite de tolerância para os ácidos gordos saturados é de $\pm 0,8$ g se o valor declarado for <4 g/100 g e de $\pm 20\%$ se o valor declarado for ≥ 4 g/100 g [2]. Em ambos os casos, neste trabalho, a percentagem de valores declarados dentro ou fora dos limites de tolerância foi muito semelhante. Por exemplo, 26% dos alimentos com valor de ácidos gordos saturados declarado

<4 g/100 g estavam fora do limite de tolerância, enquanto que para os alimentos com valor declarado ≥ 4 g/100 g, 27% também estavam fora do limite de tolerância (Figura 1).

4. CONCLUSÕES

Conclui-se, assim, ser de extrema importância que a indústria alimentar atualize continuamente os valores declarados nos rótulos, pois essa informação é crucial para os consumidores e para a elaboração de políticas alimentares. As maiores diferenças foram encontradas nas categorias *snacks* e *fast-food*. Os resultados apresentados podem ser importantes não só para os consumidores, como também para organizações de saúde pública e indústria alimentar.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo INSA, I.P. no projeto “PTranSALT (2012DAN828)” e pela União Europeia (fundos FEDER através do programa COMPETE), e através do Partnership Agreement PT2020, e fundos nacionais (FCT, Fundação para a Ciência e a Tecnologia) através do projeto LAQV/UID/QUI/50006/2013 e NORTE-07-0124-FEDER-000069 – Food Science. T.G. Albuquerque e M. Antónia Nunes agradecem as bolsas de Doutoramento SFRH/BD/99718/2014 e SFRH/BD/130131/2017 financiadas pela FCT, FSE e MCTES.

Referências

- [1] Comissão Europeia, 2012, https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/labelling_nutrition-supplements-guidance_tolerances_1212_en.pdf.
- [2] Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia, 2011, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R1169&from=PT>
- [3] TG Albuquerque, MBPP Oliveira, A Sanches-Silva, AC Bento, HS Costa, Food Funct, 2016, 7(6), 2736–2746.
- [4] TG Albuquerque, A Sanches-Silva, L Santos, HS Costa, Int J Food Sci Nutr, 2012, 63, 713–717.
- [5] TG Albuquerque, F Santos, A Sanches-Silva, MBPP Oliveira, AC Bento, HS Costa, Food Chem, 2016, 193, 187–195.

Newfood Project - food technologies valorization in traditional foods sector

Leandro Oliveira^a, Graça Teixeira^a, Duarte Torres^{b,c}, Eduardo Luís Cardoso^{a,}*

^a Universidade Católica Portuguesa, CBQF - Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Porto, Portugal

^b Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto, Porto, Portugal

^c EPIUnit - Instituto de Saúde Pública, Universidade do Porto, Porto, Portugal

* ecardoso@porto.ucp.pt

Keywords: newfood; traditional foods; innovation; entrepreneurship; agrofood.

ABSTRACT

The European food and drink sector is unique in its very high regional and continent-wide cultural diversity, which is not only a point of pride for many citizens, but also provides a framework ideally suited to foster creativity and innovation.

The NEWFOOD - Food Technologies Valorization project joins the ambitions of the 4 public Universities of the Northern Region (University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Portuguese Catholic University - Porto Regional Center, University of Minho and University of Porto) to accelerate the expansion and consolidation of the so-called "traditional products" through a proposal of innovation catalyzed by the transfer of knowledge and technology.

This project proposes three Actions that are articulated: (i) develop a knowledge and skills map of the Region and an inventory of the needs of the sector to ensure the innovation process focused on the central axes of expansion and consolidation of the sector; (ii) promote innovation projects aimed at generating new products / solutions of economic relevance in the "Traditional Products" sector and (iii) actively disseminate knowledge, skills and resources to the entities involved, including stakeholders from the relevant economic sectors.

Critical factors for the competitiveness of the traditional products sector will thus be worked out. Given the territorially distributed nature of the project, it will also promote the competitiveness of the Region associated with Agro-food activity, but also with related activities such as Tourism.

The dissemination, both national and international, of knowledge and traditional products will contribute to the notoriety and attractiveness of the Region and the Country, adding value in the production chains. In this way, it is intended to support the internationalization of value added products such as traditional products, thus promoting the competitiveness of the agro-food industry.

1. INTRODUCTION

The European food and drink sector is unique in its very high regional and continent-wide cultural diversity, which is not only a point of pride for many citizens, but also provides a framework ideally suited to foster creativity and innovation. The great variety of regional culinary traditions that have developed across Europe over the centuries ensure that the food and drink sector is deeply rooted in society [1].

Newfood — Food Technologies Valorization is a project that joins the ambitions of the four public Universities of the North Region (University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Portuguese Catholic University - Porto Regional Center, University of Minho and University of Porto) to accelerate the processes of expansion and consolidation of the so-called "traditional products" through a proposal of innovation catalyzed by the transfer of knowledge and technology. This project responds to the clear identification of “traditional” products and the evolution and adaptation of these products to modern markets, as a priority for the development of the economy in the North Region, pursuing the Regional Intelligent Specialization plan (RIS3) [2] merging agricultural and agro-food competences and resources held in the region, articulated through 4 Universities of the North Region. There are very strong, productive and structured cooperation links of varied forms between relevant actors in the agro-food sector and the Universities involved. These links include bilateral relations between companies and researchers, formal protocols and associations formed specifically to advance the R&D agenda for the sector.

Therefore, the objective of this work is to present the Newfood Project as a model for the promotion of innovation in Traditional Portuguese Products, as well as for the stimulation of entrepreneurial spirit and the transfer and valorization of scientific knowledge.

2. RATIONAL

The project's rationale is based on the unique, specialized and complementary capacities in the Northern region and its Research Centers in the Agro-food sector. Based on this coherence of competencies, a single project structured in the priority axis RIS3 - Agro-environmental Systems and Food has the capacity to mobilize the I&I of the various Entities of the Scientific and Technological System (ESTS) of the North region, relevant for this sector of activity in the dynamics of technology transfer and knowledge valorization. The Newfood project focuses on the transfer of technology to the food sector in the components of dissemination of research results to generate innovative products based on traditional food products and endogenous resources with differentiated value proposals updated to the needs of markets, for application in the food processing industry, throughout the value chain.

Thus, it proposes an articulated set of actions (Table1) for the production of structured I&I knowledge, based on the identification of the market needs and the aggregate technological offer of the partners, that support the transfer of knowledge at national and international level, creating conditions for investment in knowledge protection by European patents and in licensing strategies, as well as in the implementation of an innovation and development program focused on accelerating modernization and competitiveness in the “Traditional Products” sector, capable of increasing the readiness of people and knowledge in the relationship with the market, investors and companies.

Table1. Action and description of Newfood Project.

| <i>Action</i> | <i>Description</i> |
|--|--|
| 1- Knowledge and Needs | Mapping existing knowledge and the needs of the economic fabric in order to promote opportunities through the correspondence between knowledge - needs, generating added value. Two characterization studies will be carried out by each University, of the knowledge produced and existing, with potential for transference to the Stakeholders of the value chain. There will also be eight studies on Sector Needs conditioned by trends relevant to the value chain, supported by technical visits and participation in international events relevant to the intended dynamics. A set of Seminars / Workshops will ensure the Public Disclosure and discussion in the territory of the results of the studies carried out, including International Benchmarking with territories with dynamics in the area. The formation of the correspondence between Knowledge and Needs will be characterized in the Knowledge-Needs Matching Study with the respective public presentation to the target audience. |
| 2 - Program for the Promotion of Innovation Projects | Valuation of knowledge through its application in the development of projects oriented to the innovation and competitiveness of "Traditional Food Products" based on the differentiation of endogenous resources to the territory, with results along the value chain (primary production, processing, ingredients, industry, packaging, distribution and food service). The intention is to promote two approaches, one, the "FoodValorization" competition, based on the support of proposals for innovative projects involving Proofs of Concept and Business Projects for Entrepreneurship - oriented to new business initiatives in the value chain; another, the "NewFood" competition, based on support for a selection of innovation proposals with projects of economic relevance and with added value for Prototyping. The projects and their results will be presented publicly at the Fine Showcase and Food Festival sessions, seeking to create conditions for stakeholder evaluation and promotion of knowledge transfer in the sector. |
| 3 - Promotion of Knowledge and Innovation | Promotion of the transfer of knowledge to the economic fabric, extended to the whole value chain, through practical and demonstrative actions as well as through concrete projects with companies, of innovation for the availability of the capacities and resources existing in the Research Centers. Promotion of applied knowledge and innovation potential in the area to the national business community, the national and international consumer, and the technical and scientific community through a set of actions that include videos, campaigns on social networks, communications and publications of different nature at the level National and international. |

3. EXPECTED RESULTS

3.1 Action 1 - Knowledge and Needs

8 Knowledge Mapping Studies; 8 Needs and Trends Studies; 8 Seminars of Disclosure in the Territory of Trends and Benchmarking; 4 International technical visits to Territories / Regions

with relevant dynamics; 1 Knowledge Matching Study – Needs; 1 Public presentation of the Matching Study (100 participants); 4 Participation in International Events by Partner.

3.2 Action 2 - Program for the Promotion of Innovation Projects

A "FoodValorization" competition for a selection of 16 Proof of Concept Projects and Business Project for Entrepreneurs with cash and expense awards; A "NewFood" competition for a selection of 8 Projects for Prototyping to be developed based on cash and expense premiums; A Final ShowCase presenting the 24 FoodValorization and NewFood Projects and their results to an audience of Companies, Entrepreneurs, Investors and Stakeholders in general; A FoodFestival for contextualized and articulated promotion with sectors of related activity, in particular the Tourism.

3.3 Action 3 - Promotion of Knowledge and Innovation

8 Sectoral Seminars / Workshops; 8 Thematic / Functional Seminars / Workshops; 40 Videos about Products, Services, Projects; 8 Social Networking Campaigns; 8 Thematic Publications; 8 Technical and Scientific Communications; 8 Publications in Technical and Scientific Journals; 8 Open Access for Scientific Publications.

4. FINAL REMARKS

The Newfood project has an ambition focused on the Portuguese Traditional Food Products sector in the North region and its ESTS. In terms of stimulating the search for R&I the scope was national and includes international dimensions. The project aims to contribute to the sustainability of knowledge transfer to the sector, through: promoting the dynamism of the University-Company interface; the consolidation and opening of national and international knowledge transfer channels; the establishment of economic valuation practices in the field of researchers in areas that have a temporal relevance and are easier to institutionalize in the context of a research program and postgraduate studies, and also by the structuring of know-how associated with the processes inherent to the competitions and entrepreneurship programs underway.

Acknowledgements

NEWFOOD — Food Technologies Valorization (NORTE-01-0246-FEDER-000043) is co-financed by the Regional Operational Program of the North (Norte2020), under the PORTUGAL 2020 Partnership Agreement, through the implementation of the of the European Regional Development Fund (ERDF).

References

- [1] European Technology Platform Food for Life, Food for Tomorrow's Consumer, 2016, ETP 'Food for Life': Brussels.
- [2] CCDRN, NORTE2020 - Estratégia Regional de Especialização Inteligente, 2014, Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional do Norte: Porto.

***Calluna vulgaris* (L.) Hull: composição nutricional e caracterização do perfil fenólico**

Filipa Mandim^a, Lillian Barros^a, Eliana Pereira^a, Paulo F. Santos^b, Isabel C. F. R. Ferreira^{a}*

^a Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal

^b Centro de Química – Vila Real (CQVR), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

* iferreira@ipb.pt

Palavras chave: *Calluna vulgaris* (L.) Hull, composição nutricional, composição fenólica

RESUMO

Calluna vulgaris (L.) Hull, vulgarmente conhecida por urze ou torga, é um arbusto de pequenas dimensões. É amplamente utilizada na medicina tradicional devido às diferentes propriedades medicinais que lhe são associadas, entre as quais, propriedades antissépticas, anti-inflamatórias, antirreumáticas e diuréticas.

As sumidades floridas deste arbusto foram analisadas relativamente ao seu valor nutricional. Foi determinado o teor em cinzas, gorduras, proteínas, hidratos de carbono, e o valor energético, utilizando métodos oficiais de análise de alimentos. Foram ainda determinados os perfis individuais de ácidos gordos, ácidos orgânicos, açúcares livres e tocoferóis por métodos cromatográficos. Os hidratos de carbono foram os macronutrientes maioritários, seguidos de proteínas e lípidos. Os açúcares identificados foram glucose e frutose. Os ácidos oxálico, quínico, ascórbico e cítrico foram os quatro ácidos orgânicos identificados. Verificou-se também a presença das quatro isoformas de tocoferóis e de dezasseis ácidos gordos.

O perfil fenólico de cinco extratos orgânicos obtidos através de um processo de extrações sucessivas, por maceração, à temperatura ambiente e sob vigorosa agitação, com solventes orgânicos de crescente polaridade (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona e metanol) foi analisado por HPLC-DAD-ESI/MS; bem como o de dois extratos aquosos: infusão e decocção. Dos 12 compostos fenólicos identificados, a miricetina-3-*O*-glucósido e a miricetina-*O*-ramnósido revelaram ser os compostos maioritários.

1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade que as plantas medicinais são utilizadas como auxiliares de cura e tratamento de diversas doenças. Nos últimos anos tem-se verificado um crescente interesse por matrizes naturais. Fatores como a imensa variedade de compostos bioativos presentes nestas matrizes, bem como as diferentes propriedades farmacológicas demonstradas e a crescente atenção e procura por parte dos consumidores, por opções alimentares mais saudáveis e, simultaneamente, com efeitos benéficos para a saúde foram importantes contribuições para esse interesse [1].

Calluna vulgaris (L.) (*Ericaceae*) (**Figura 1**) é um arbusto de pequenas dimensões, comumente denominado por urze ou torga. Os constituintes deste arbusto são amplamente

utilizados na medicina tradicional com variadas finalidades. A aplicação mais conhecida da urze está associada ao tratamento de problemas do trato urinário, resultado das suas propriedades diuréticas, depurativas e antissépticas [2,3]. Através de metodologias científicas, foi demonstrado que extratos obtidos a partir da *C. vulgaris*, têm eficácia contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, bem como capacidade para inibir o crescimento de bactérias patogénicas sem interferir com a microbiota vaginal [4]. Encontram-se igualmente descritas aplicações tópicas, através de cataplasmas, para o tratamento de problemas de pele como eczema, feridas, frieiras e acne, bem como para o alívio de dores reumáticas, artrite e reumatismo [2]. A aplicação tópica de extratos da urze em ratos SKH-1 revelou um efeito protetor antes da exposição a raios UVB, diminuindo as queimaduras solares, bem como processos como a inflamação e oxidação [5,6].



Figura 1. Exemplar do arbusto *Calluna vulgaris* (L.) Hull e respetiva floração.

O teor em compostos fenólicos de *C. vulgaris* tem sido descrito na literatura que refere que os seus extratos possuem elevado conteúdo nestas moléculas, nomeadamente derivados de flavonoides (quercetina e canferol) e ácidos fenólicos, como o ácido 5-*O*-cafeoilquínico [7]. Diferentes estudos demonstraram que a quantidade destes compostos é influenciada pela época de colheita e pelo estado de maturação da planta, mas também pela técnica de extração e solventes que são aplicados [3].

Neste trabalho, foi avaliada a composição nutricional e química das sumidades floridas da *C. vulgaris* (urze), bem como o perfil fenólico de cinco extratos orgânicos (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona e metanol) e de dois extratos aquosos (infusão e decocção).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Preparação da amostra

As sumidades floridas da urze foram obtidas já secas através da empresa portuguesa *Girassol* e reduzidas a um pó fino para posterior análise.

2.2. Caracterização nutricional e química das sumidades floridas de *C. vulgaris*

A sua composição nutricional foi analisada através de métodos oficiais de análise de alimentos. Foi determinado o teor em cinzas (incineração a 550 °C), gorduras (extração em Soxhlet com éter de petróleo), proteínas (método macro-Kjeldahl), hidratos de carbono e o valor energético. Foram também caracterizados os perfis individuais de ácidos gordos (GC-FID), ácidos orgânicos (UFLC-PDA), açúcares livres (HPLC-RI) e tocoferóis (HPLC-fluorescência).

2.3. Preparação dos extratos orgânicos e aquosos das sumidades floridas de *C. vulgaris*

Foram obtidos cinco extratos orgânicos com solventes de polaridade crescente (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona e metanol), através de extrações sucessivas, por maceração, à temperatura ambiente e sob vigorosa agitação; bem como dois extratos aquosos através das metodologias utilizadas na medicina tradicional: infusão e decocção.

2.4. Identificação e quantificação do perfil fenólico das sumidades floridas de *C. vulgaris*

O perfil fenólico de cada um destes extratos foi avaliado por HPLC-DAD-ESI/MS seguindo um procedimento anteriormente descrito [4].

2.5. Análise estatística

Os ensaios descritos foram realizados utilizando três amostras e efetuados em triplicado, sendo os resultados expressos como valores médios \pm desvio padrão (SD). Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste HSD de Turkey com $\alpha = 0,05$, utilizando o programa SPSS v. 23.0.

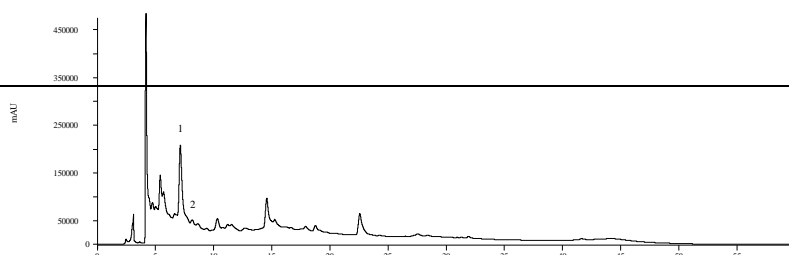
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos para o perfil nutricional, as sumidades floridas de *C. vulgaris* apresentaram hidratos de carbono como macronutriente maioritário (83,1 mg/100 g dw), seguidos de proteínas (8,4 mg/100 g dw) e lípidos (4,42 mg/100 g dw). Apresentou um teor em cinzas de 4,06 mg/100 dw e a energia fornecida, por cada 100 g de planta, foi de 406 kcal.

Foram identificados quatro ácidos orgânicos, ácido oxálico, quínico, ascórbico e cítrico. O ácido cítrico foi o composto maioritário (0,586 g/100 g dw) e o ácido ascórbico o minoritário (0,0166 g/100 g dw).

Relativamente aos tocoferóis, foram identificados o α , β , γ e o δ -tocoferol, sendo que o α -tocoferol revelou ser o tocoferol maioritário ($5,84 \pm 0,07$ mg/100 g dw) e o β -tocoferol o minoritário ($0,2500 \pm 0,0001$ mg/100 g dw).

Foram identificados 12 compostos fenólicos nos extratos de *C. vulgaris* (**Figura 2**), dois derivados de ácidos fenólicos, e dez flavonoides (nove flavonóis e um flavan-3-ol). Dos extratos obtidos, a infusão revelou a maior concentração em compostos fenólicos, seguida da decocção e dos extratos de metanol, acetona, acetato de etilo e do extrato de *n*-hexano. O extrato de diclorometano não apresentou nenhum dos compostos fenólicos identificados.



A**B**

Figura 2. Perfil fenólico do extrato metanólico das sumidades floridas de *C. vulgaris* a 280 nm (**A**) e a 370 nm (**B**).

4. CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu analisar a composição nutricional e química das sumidades floridas de *C. vulgaris*, bem como caracterizar em termos de compostos fenólicos sete extratos obtidos através de diferentes técnicas de extração e com solventes de distinto grau de polaridade. Verificou-se que, quanto maior o grau de polaridade do solvente de extração, maior o teor em compostos fenólicos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FCT, Portugal e FEDER (Programa PT2020) pelo apoio financeiro ao CIMO (UID/AGR/00690/2013), CQ-VR (UID/QUI/00616/2013); programa FEDER-Interreg Espanha-Portugal pelo apoio financeiro através do projeto 0377_Iberphenol_6_E.

Referências

- [1] N Martins, ICFR Ferreira, Trends Food Sci Technol, 2017, 67, 12-18.
- [2] JM Neves, C Matos, C Moutinho, G Queiroz, LR Gomes, J Ethnopharmacol, 2009, 124, 270-283.
- [3] M Monschein, JN Iglesias, O Kumert, Phytochem Rev, 2010, 205-215.
- [4] AFM Pires, Caracterização Química e Avaliação das Propriedades Bioativas das Sumidades Floridas de *Calluna vulgaris* (L.) Hull, 2016.
- [5] GA Filip, ID Postescu, C Tatomir, A Muresan, S Clichici, J Physiol Pharmacol, 2012, 63, 423-432.
- [6] ED Olteanu, GA Filip, S Clichici, D Daicoviciu, M Achim, ID Postescu, P Bolfa, L Bolojan, L Vlase, A Muresan, J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2012, 31, 233-243.
- [7] P Drózd, A Sentkowska, K Pyrzynska, Acad J Med Plant, 2016, 4, 75-80.

Portuguese olive oils and table olive with quality certification schemes: achievements and needs

Tânia Gonçalves Albuquerque^{a,b,}, Helena S. Costa^{a,b}, M. Beatriz P.P. Oliveira^b*

^a Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P., Lisboa, Portugal

^b REQUIMTE, LAQV/Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal

*tania.g.alb@gmail.com

Keywords: olive oil, certification schemes, PDO, PGI, table olives

ABSTRACT

Olive oil is, all over the World, but especially among Mediterranean consumers, perceived as a source of valuable natural compounds with putative health benefits. To protect consumers, but also producers from unfair practices, European Union has launched legislation on different EU quality schemes, namely Protected Designation of Origin (PDO), Protected Geographical Indications (PGI) and Traditional Specialty Guaranteed (TSG). The current review intends to provide an overview of relevant research concerning Portuguese PDO olive oils and table olives.

The electronic databases PubMed, Web of Science, Google Scholar, Science Direct, Database of origin and registration (DOOR) and Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics (FAOSTAT) were searched to perform this review. The following criteria were applied for manuscripts inclusion: (i) English or Portuguese language; and (ii) data on Portuguese olive oils and table olives. Studies on marketing and business, as well as consumers' preferences were excluded.

Concerning olive oils and table olives, across European countries, up to now, there are 102 olive oils and 21 table olives registered as PDO or PGI, and the countries with the highest percentage of registered foods are Italy, Spain and Greece, which are Mediterranean countries. For the phytochemical characterization of Portuguese PDO olive oils and table olives, there is a lack of information in the literature, especially for PDO Negrinha de Freixo and PDO Elvas and Campo Maior table olives. Regarding olive oils, PDO Trás-os-Montes and PDO Norte Alentejano are the most studied. According to this literature review, for Portuguese PDO olive oils, the most frequent compounds assessed up to now are vitamin E and carotenoids. For instance, a range between 95.9 and 260 mg/kg for α -tocopherol was reported for PDO Trás-os-Montes olive oils, while for PDO Norte Alentejano olive oils it varied from 92.6 to 198 mg/kg. Undoubtedly, data concerning the phytochemical characterization of these PDO olive oils and table olives is of utmost importance to accurately distinguish them from other similar products and to highlight their differences. Further studies, especially concerning parameters that allow confirming the authenticity and origin of Portuguese PDO olive oils and table olives are crucial.

1. INTRODUCTION

To protect consumers, but also producers from unfair practices, European Union has launched legislation on the different EU quality schemes [1-5]. Three types of designations were defined, namely, Protected Designation of Origin (PDO), Protected Geographical Indications (PGI) and Traditional Speciality Guaranteed (TSG). Nowadays, the foods registered with a EU quality scheme are easily distinguished from other similar foods by means of a label.

Olive oil is, all over the World, but especially among Mediterranean consumers, perceived as a source of valuable natural compounds with putative health benefits, but it is necessary to assure their quality and to prevent adulteration [6]. However, it is difficult to have reliable analysis on the fast detection of possible fraud [7].

Olive production is increasing all over the world, but especially in Europe. Between 1990 and 2010, the world olive oil production significantly increased. Although, in the last years, it decreased from 3,075.0 to 2,539.0 million tonnes [8]. In 2016/17, Europe contributed with 68.8% of the total olive oil produced, being Spain the top leading country with 73.7%. For Portugal, the production of olive oil has significantly increased in the last years, especially between 2000/01 (24.6 million tonnes) and 2010/11 (62.9 million tonnes).

World production of table olives has increased from around 950.0 million tonnes in 1990/91 to 2,892.5 million tonnes in 2016/17. According to the data reported by International Olive Council, Europe production of table olives is lower compared with olive oil [8]. In 2016/17, Europe contributed with around 29% of the table olives world production. Spain is still the country with the largest production (596.1 million tonnes in 2016/17), followed by Greece (180.0 million tonnes).

The current review intends to provide an overview of all relevant research concerning Portuguese PDO olive oils and table olives.

2. MATERIALS AND METHODS

The electronic databases PubMed, Web of Science, Google Scholar, Science Direct, Database of origin and registration (DOOR) and Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics (FAOSTAT) were searched to perform this review. The following criteria were applied for manuscripts inclusion: (i) English or Portuguese language; and (ii) presence of Portuguese olive oils and table olives data. Studies on marketing and business, as well as consumers' preferences were excluded.

3. RESULTS AND DISCUSSION

In Europe up to May 2018, 1403 agricultural products and foodstuffs were registered with EU quality schemes [9]. From these products, 719 were registered as PGI, while 626 were registered as PDO and 58 as TSG. Italy, France, Spain and Portugal are the countries with the highest percentage of registered foods, representing 21%, 18%, 14% and 10%, respectively.

Concerning olive oils and table olives, across European countries, up to now, there are 102 olive oils and 21 table olives registered as PDO or PGI, and the countries with the highest percentage of registered foods are Italy, Spain and Greece, which are Mediterranean countries.

In Portugal, in what concerns to table olives and olive oils, 8 products are already registered as PDO, namely Azeitonas de conserva de Elvas e Campo Maior, Azeitonas de conserva Negrinha de Freixo, Azeite do Alentejo Interior, Azeites do Norte Alentejano, Azeites do Ribatejo, Azeites da Beira Interior, Azeite de Moura and Azeite de Trás-os-Montes.

PDO olive oils and table olives have specific features concerning the olive cultivars, conditions for picking, transportation to the mill, processing conditions and characteristics of the final product.

For the phytochemical characterization of Portuguese PDO olive oils and table olives, there is a lack of information in the literature, especially for PDO Negrinha de Freixo and PDO Elvas and Campo Maior table olives. The information concerning the nutritional composition and bioactive compounds for Portuguese PDO olive oils is also very scarce [10-17]. Notwithstanding, several papers were published with the characterization of Portuguese olive oils, but for products that are not registered with a EU quality scheme [10-17]. Up to now, PDO Trás-os-Montes is the most characterized PDO Portuguese olive oil.

Table 1. Phytochemical features of Portuguese PDO olive oils.

| PDO olive oils | Lutein (mg/kg) | β-Carotene (mg/kg) | α-tocopherol (mg/kg) | Oleic acid (% total fatty acids) |
|-----------------------|---------------------------|--|---|---|
| Trás-os-Montes | 2.32 | 5.05 | 148 | 75.5 |
| Norte Alentejano | 2.66 | 5.24 | 145 | 75.3 |
| Moura | 2.64 | 4.84 | 165 | 75.0 |
| Beira Interior | 2.11 | 3.85 | 131 | 67.7 |

According to this literature review, for Portuguese PDO olive oils, the most frequent compounds assessed up to now are vitamin E and carotenoids (Table 1). In general, the PDO olive oils have higher amounts of β -carotene (4.95 mg/kg) than lutein (2.39 mg/kg).

A range between 95.9 and 260 mg/kg for α -tocopherol was reported for PDO Trás-os-Montes olive oils, while for PDO Norte Alentejano olive oils it varied from 92.6 to 198 mg/kg. For all the samples studied of PDO olive oils, the major fatty acid was oleic acid (C18:1), followed by palmitic (C16:0) and linoleic acids (C18:2).

4. CONCLUSIONS

A high variability between the different PDO products was observed for the reported compounds, which is mainly linked with specific features of the region of origin. Undoubtedly, data concerning the phytochemical characterization of these PDO olive oils and table olives is of utmost importance to accurately distinguish them from other similar products and to highlight their differences. Further studies, especially concerning parameters that allow confirming the authenticity and origin of Portuguese PDO olive oils and table olives are crucial.

Acknowledgements

This work was funded by European Union (FEDER funds through COMPETE), under the Partnership Agreement PT2020, and National Funds (FCT, Foundation for Science and Technology) through project LAQV/UID/QUI/50006/2013 and NORTE-07-0124-FEDER-000069 – Food Science. T.G. Albuquerque is grateful for PhD fellowship (SFRH/BD/99718/2014) funded by FCT, FSE and MEC.

References

- [1] EEC Regulation No. 2081/92 of 14 July 1992, Off. J. Eur. Comm. 1992, L208, 1.
- [2] EEC Regulation No. 2082/92 of 14 July 1992, Off. J. Eur. Comm. 1992, L208, 9.
- [3] EC Regulation No. 509/2006 of 20 March 2006, Off. J. Eur. Comm. 2006, L93, 1.
- [4] EC Regulation No. 510/2006 of 20 March 2006, Off. J. Eur. Comm. 2006, L93, 12.
- [5] EU Regulation No. 1151/2012 of 21 November 2012, Off. J. Eur. Union 2012, L343, 1.
- [6] E Psomiadou, KX Karakostas, G Blekas, MZ Tsimidou, D Boskou, Eur J Lipid Sci Technol, 2003, 105, 403.

- [7] Z Likudis, In Products from Olive Tree, (Ed: D. Boskou), IntechOpen, 2016, Ch. 10.
- [8] <http://www.internationaloliveoil.org/> (International Olive Council)
- [9] <http://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/list.html?locale=pt> (DOOR, Database of origin and Registration)
- [10] SC Cunha, JS Amaral, JO Fernandes, MBPP Oliveira, J Agric Food Chem, 2006, 54, 3351.
- [11] JA Pereira, APG Pereira, ICFR Ferreira, P Valentão, PB Andrade, R Seabra, L Estevinho, A Bento, J Agric Food Chem, 2006, 54, 8425.
- [12] AF Vinha, F Ferreres, BM Silva, P Valentão, A Gonçalves, JA Pereira, MB Oliveira, RM Seabra, PB Andrade, Food Chem, 2005, 89, 561.
- [13] I Gouvinhas, J Machado, S Gomes, J Lopes, P Martins-Lopes, AIRNA Barros, J Am Oil Chem Soc, 2014, 91, 1197.
- [14] P Simões-Lopes, MF Peres, MC Pinheiro-Alves, MP Sequeira-Antunes, EA Cordeiro, Melhoramento 2002, 38, 266.
- [15] JA Pereira, S Casal, A Bento, MBPP Oliveira, J Agric Food Chem, 2002, 50, 6335.
- [16] F Peres, HH Jeleń, MM Majcher, M Arraias, LL Martins, S Ferreira-Dias, Food Res Int, 2013, 54, 1979.
- [17] R Malheiro, S Casal, SC Cunha, P Baptista, JA Pereira, PLoS ONE 2015, 10, 1.

Serpa PDO cheese: towards identification of chemical markers involved in organoleptic attributes

Helena Araújo-Rodrigues^a, Freni K. Tavarina^a, Maria Teresa P.G. Dos Santos^b, Nuno Alvarenga^{c,d}, Manuela M. Pintado^{a,}*

^aCBQF, Universidade Católica Portuguesa, Porto, Portugal.

^bESA, Instituto Politécnico de Beja, Beja, Portugal.

^cUTI, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Oeiras, Portugal.

^dLEAF, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal. *mpintado@porto.ucp.pt

KEYWORDS: Serpa cheese; Sensorial markers; FAAs; Organic acids; Volatile compounds.

ABSTRACT

Serpa is a PDO cheese manufactured using raw ovine milk and extracts of *C. cardunculus* L. as rennet, without addition of starter cultures and followed by a minimum (but safe) ripening period. Both the processing technology and ingredients used result in a high microbial biodiversity that allows the development of a unique flavor. Variations in the manufacture process and distinct milk composition among producers result in a considerably heterogeneous cheese. The present study aimed at screening some groups of sensorial related compounds during two consecutive months of production, towards the identification of chemical markers involved in the specificity of Serpa cheese. The results suggested a high diversity and heterogeneous chemical composition according to the producer and month. The free amino acids (FAAs) profile suggested the presence of almost all amino acids in the analyzed cheeses, being glutamic acid, alanine, leucine, valine and phenylalanine the most prevalent ones. Regarding the organic acid profile, lactic and acetic acids were the dominant groups. The volatile analysis suggested a high diversity and variability of volatile composition between cheeses, including several chemical groups, namely, ethyl esters, aldehydes and alcohols. The identification of sensorial chemical markers will be crucial to guide the selection and development of an autochthonous starter culture to improve Serpa's quality and safety.

1. INTRODUCTION

Serpa is a ripened cheese manufactured in a demarcated area in the South Alentejo region and considered one of the most famous Protected Designation of Origin (PDO) Portuguese cheeses. During the cheesemaking process, raw ovine milk and the *Cynara cardunculus* L. vegetable rennet are used, without addition of starter cultures and followed by a minimum (but safe) ripening period. Both the processing technology and ingredients used result in a cheese characterized by its high microbial biodiversity that allows the development of a characteristic strong and exquisite flavor coupled with a semi-soft and creamy texture [1]. Variations in the manufacturing process and distinct milk composition among producers influence the sensorial profile of raw milk cheeses, which may result in a final product considerably heterogeneous and, in some cases, with organoleptic defects [2]. The implementation of an autochthonous starter culture constitutes a possible way to improve the

cheesemaking process of PDO cheeses, minimizing their sensorial defects as well as the safety risks associated to the presence of some microbial groups in raw milk [2,3].

The screening of organoleptic related compounds is crucial for the identification of chemical markers involved in the specific properties of traditional cheeses and will guide the selection and development of an autochthonous starter culture [1]. Accordingly, this work aimed at assessing the volatile and a group of non-volatile compounds (FAAs and organic acids) present in Serpa cheese, from four distinct PDO producers in two consecutive months.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Cheese samples

Serpa cheeses were obtained from four PDO certified industries (A, B, C and D), being manufactured according to the specifications described by Dos Santos *et al.* [4]. Cheeses were analyzed in duplicate for each producer from the core of ripened cheeses (30 days-old) in two consecutive months of production (February and March).

2.2 Free Amino acid profile

In order to separate, identify and quantify the FAAs, high performance liquid chromatography (HPLC) was used. The FAAs were extracted independently and in duplicate. Sample preparation was carried out using the Pico-Tag™ method [5]. In the HPLC analysis, the method and conditions described by Pripis-Nicolau *et al.* were followed [6].

2.3 Organic acid profile

The organic acids present in cheese samples were also separated and quantified by HPLC, where duplicate samples were extracted and analyzed independently. The sample preparation method and HPLC conditions for organic acid analysis described by Sousa *et al.* were followed, with slight modifications (temperature was maintained at 40 °C) [7].

2.4 Volatile compounds screening

In order to evaluate the volatile content, headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled to gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) was used. For sample preparation, 5 g of each cheese sample were macerated and homogenized. During pre-incubation, HS-SPME and GC-MS, conditions described by Oliveira *et al.* were followed [8].

3. RESULTS AND DISCUSSION

During the ripening period, several reactions occur in cheese resulting in a unique organoleptic profile. The screening of sensorial related compounds across different times of production such as, FAAs, organic acids and volatile compounds is important to identify chemical markers involved in Serpa cheese uniqueness. The FAAs composition of cheeses with 30 days during two consecutive months of production is shown in Table 1, suggesting the presence of almost all amino acids in the analyzed cheeses as well as a quantitative variation according to the PDO producer and month of production. However, Glu, Ala, Leu, Val and Phe were the most prevalent FAAs in all samples, with concentrations ranging between 13.10 and 83.48 mg/100g. The preliminary results may indicate that this group of FAAs is the more prevalent in Serpa cheese with 30 days of ripening and probably may have an important role in their specificity.

Table 1. Concentration of FAAs (mg/100g) in Serpa cheeses (n=4) with at least 30 days of ripening, from four PDO certified producers (A, B, C and D) in two consecutive months of production.

| | February | | | | March | | | |
|-----|-------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | A | B | C | D | A | B | C | D |
| F | 8.64±1.41 ^a | 5.92±1.29 ^a | 8.64±4.82 ^a | 7.82±3.14 ^a | 5.35±2.52 ^a | 7.65±2.43 ^a | 11.18±3.02 ^b | 9.32±2.88 ^a |
| A | 64.43±9.49 ^a | 43.87±10.74 ^a | 47.82±27.13 ^a | 51.30±6.56 ^a | 54.07±10.98 ^a | 22.65±6.39 ^b | 53.78±6.84 ^a | 55.67±12.40 ^a |
| Asp | 0.10±0.10 ^a | 0.05±0.01 ^a | 0.04±0.04 ^a | 0.05±0.04 ^a | 0.93±1.42 ^a | 0.18±0.11 ^a | 0.14±0.11 ^a | 0.19±0.13 ^a |
| Glu | 0.61±0.2 ^a | 0.36±0.20 ^a | 0.76±0.53 ^a | 0.32±0.04 ^a | 4.51±4.75 ^a | 0.55±0.13 ^a | 0.31±0.07 ^a | 0.41±0.41 ^a |
| Cys | 0.47±0.09 ^a | 1.02±0.58 ^a | 2.16±1.37 ^a | 1.81±1.21 ^a | 5.83±6.40 ^a | 0.60±0.20 ^a | 1.50±0.24 ^a | 0.48±0.16 ^a |
| Asn | 0.35±0.49 ^a | 1.71±0.35 ^a | 4.85±4.75 ^a | 3.78±3.64 ^a | 4.70±4.58 ^a | 4.23±1.53 ^a | 4.54±0.80 ^a | 7.77±1.07 ^a |
| Ser | 1.55±0.26 ^a | 1.26±0.36 ^a | 1.74±1.06 ^a | 2.21±1.08 ^a | 1.82±1.30 ^a | 2.06±0.67 ^a | 3.80±0.43 ^a | 3.44±1.89 ^a |
| His | 4.51±0.56 ^a | 4.05±1.08 ^a | 7.08±4.15 ^a | 4.38±1.37 ^a | 5.57±0.80 ^a | 2.56±0.56 ^b | 12.23±2.22 ^c | 4.34±1.50 ^{a,b} |
| Gln | 3.23±0.48 ^a | 6.42±4.93 ^a | 9.92±8.45 ^a | 10.49±9.25 ^a | 6.23±8.76 ^a | 1.78±0.82 ^a | 1.16±0.38 ^a | 3.25±1.66 ^a |
| Thr | 13.10±1.07 ^a | 14.19±8.38 ^a | 14.44±8.54 ^a | 20.88±3.33 ^a | 21.76±1.84 ^a | 14.28±4.05 ^b | 13.85±2.57 ^b | 14.84±2.16 ^b |
| Arg | 0.37±0.03 ^a | 5.37±3.91 ^a | 2.50±1.58 ^a | 5.71±3.85 ^a | 3.33±2.76 ^a | 1.57±1.57 ^a | 1.03±0.15 ^a | 0.76±0.87 ^a |
| Ala | 26.38±5.3 ^a | 34.83±13.25 ^a | 46.29±25.64 ^a | 46.55±9.89 ^a | 42.88±6.81 ^a | 65.00±23.50 ^a | 55.63±8.93 ^a | 82.44±19.24 ^b |
| Tyr | 1.97±0.18 ^a | 4.62±3.07 ^{a,b} | 6.04±4.13 ^{a,b} | 7.87±2.41 ^b | 11.59±3.23 ^{a,d} | 5.72±2.20 ^{a,c} | 3.81±0.90 ^c | 13.32±5.17 ^d |
| Val | 0.62±0.01 ^a | 1.25±0.68 ^a | 1.28±0.23 ^a | 1.77±1.04 ^a | 1.46±0.02 ^a | B.D.T. | B.D.T. | 0.11±0.16 ^a |
| Met | 14.26±0.88 ^a | 21.83±4.95 ^{a,b} | 30.99±17.11 ^b | 27.07±7.52 ^{a,b} | 22.33±5.05 ^a | 22.91±5.85 ^a | 25.86±6.27 ^a | 22.81±3.59 ^a |
| Trp | 2.53±0.22 ^a | 9.31±6.03 ^{a,b} | 12.38±10.14 ^{a,b} | 16.02±4.66 ^b | 10.21±0.89 ^{a,b} | 9.57±5.59 ^{a,b} | 6.60±1.20 ^a | 15.24±2.56 ^b |
| Phe | 41.18±1.81 ^a | 54.78±13.58 ^{a,b} | 72.63±36.10 ^b | 71.13±13.57 ^b | 56.01±7.59 ^a | 67.11±5.88 ^{a,b} | 83.48±17.80 ^b | 80.96±9.49 ^b |
| Ile | | | | | | | | |
| Leu | | | | | | | | |

B.D.L.- Below to the detection threshold. Means in the same line and corresponding to the same month of production with different superscript letters differ significantly (p<0.05).

Regarding the organic acids profile, the results suggested significant differences according to the producer, with lactic acid as the most abundant, being followed by acetic acid (Table 2). The producers B and D also possess a high incidence of butyric and propionic acids comparatively to the other producers in both months. The presence of propionic and butyric acids is related with the intensity of bacterial fermentation during maturation period, typically increasing throughout this period. Acetic acid typically has higher concentrations in longer ripened cheeses. Although lactic acid is the most abundant in similar types of cheeses and maturation times [9] in producer B the content is much lower in both months, that showed the highest concentrations of propionic and butyric acids.

Table 2. Concentration of organic acids (mg/100g) in Serpa cheeses (n=4) with at least thirty days of ripening, from four PDO certified producers (A, B, C and D) in two consecutive months of production.

| | | Organic acids | | | |
|----------|---|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| | | Lactic acid | Acetic acid | Propionic acid | Butyric acid |
| February | A | 1881.26±60.35 ^a | 170.66±8.71 ^a | 5.87±2.05 ^a | 4.37±4.38 ^a |
| | B | 992.72±471.86 ^b | 212.76±30.04 ^a | 22.58±7.81 ^b | 21.95±6.28 ^b |
| | C | 1668.12±724.20 ^{a,b} | 198.72±50.40 ^{a,b} | 7.09±1.73 ^a | 2.65±2.97 ^a |
| | D | 1268.02±97.92 ^b | 120.92±12.50 ^b | 9.74±1.81 ^a | 21.03±2.19 ^b |
| March | A | 946.09±6.25 ^a | 318.62±19.26 ^{a,b} | 6.96±2.05 ^a | 5.40±1.26 ^a |
| | B | 645.03±160.41 ^a | 359.44±82.31 ^b | 77.01±16.83 ^b | 41.82±29.40 ^b |
| | C | 1700±348.81 ^b | 238.27±41.03 ^a | 5.87±1.07 ^a | B.D.T. |
| | D | 1185.88±507.73 ^{a,b} | 265.05±29.86 ^{a,b} | 10.76±3.74 ^a | 19.93±10.52 ^{a,b} |

B.D.L.- Below to the detection threshold. Means in the same column and corresponding to the same month of production with different superscript letters differ significantly (p<0.05).

The target cheeses owned a great variability in volatile composition between producers and months of production. Despite of the diversity reported, the results suggested the presence of several chemical groups such as, aldehydes, aromatic compounds and ketones (data not shown). All samples analyzed possessed high levels of ethyl esters (e.g. butanoic, caprylic and caproic

acids), short-chain acids (e.g. acetic and butyric acid) and alcohols (e.g. 1-propanol and 1-octanol). The high variability and incidence of these groups was also found in Serra da Estrela cheese (also manufactured with raw ewe's milk and coagulated with *C. cardunculus* L.) [10].

4. CONCLUSIONS

Physicochemical and microbiological variations in milk composition as well as the differences in the manufacturing practices greatly influence the final sensorial characteristics of cheese. Accordingly, the screening over time of key compounds involved in the organoleptic attributes have been performed in order to evaluate Serpa PDO cheeses from distinct producers. The preliminary results included two consecutive months of production (February and March) but suggested a high chemical diversity and variation according to the industry and month of production. A higher incidence of some compounds in all cheeses was found: a group of FAAs (Glu, Ala, Leu, Val and Phe), lactic and acetic acids and, in the case of volatiles, short-chain fatty acids, alcohols and ethyl esters. It will be important to continue this screening over different times of production as well as throughout the ripening process to understand if this and other groups of compounds are involved in the specificity of Serpa cheese. The identification of sensorial markers will be crucial to guide the selection and development of an autochthonous starter culture to improve Serpa's quality and safety.

Acknowledgements

This work was supported by the national funds through the ministry of Agriculture and Rural Development and co-financed by the European Agricultural Fund for Rural Development (EAFRD), through the partnership agreement Portugal_2020 - PDR, under the project PDR2020-101-031017: SerpaFlora - Valorização da flora autóctone do queijo Serpa. We would also like to thank the scientific collaboration of CBQF under the FCT project UID/Multi/50016/2013.

References

- [1] MLB Roseiro, RA Wilbey, M Barbosa, *Le Lait*, 2003, 83(6), 469-481.
- [2] MC Montel, S Buchin, A Mallet, C Delbes-Paus, F Berthier, *Int J Food Microbiol*, 2014, 177, 136-154.
- [3] T Silvetti, E Capra, S Morandi, P Cremonesi, M Decimo, M Brasca, *J. Food Sci. Technol*, 2017, 84, 821-831.
- [4] MTP Dos Santos, MJ Benito, MDG Córdoba, C Egas, S Ruiz-Moyano, *J. Food Sci.*, 2018, 83(5), 1333-1341.
- [5] ML Alonso, AL Alvarez, J Zapico, *J Liq Chromatogr*, 1994, 17, 4019-4030.
- [6] L Pripis-Nicolau, G de Revel, S Marchand, AA Beloqui, A Bertrand, *J Sci Food Agric*, 2001, 81(8), 731-738.
- [7] S Sousa, J Pinto, C Pereira, FX Malcata; MTB Pacheco, AM Gomes, M Pintado, *J Food and Bioprod Process*, 2015, 95, 96-105.
- [8] CM Oliveira, SA Santos, AJ Silvestre, AS Barros, ACS Ferreira, AM Silva, *Food Chem*, 2017, 228, 618-624.
- [9] G Zeppa, L Rolle, *Ital. J. Food Sci*, 2008, 20, 127-139.
- [10] S Dahl, FK Tavaría, FX Malcata, *Int Dairy J*, 2000, 10(4), 255-262.

Características físico-químicas da farinha alimentar da couve “Penca da Póvoa” (*Brassica oleracea* L. var. *Costata*), obtida a partir de diferentes métodos de secagem

Cristina Duarte^{a*}, Patrícia Sousa^a, Rita Pinheiro^{a,b}, Manuela Vaz Velho^a

^a Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Portugal

^b Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, Portugal
duartede@ipvc.pt

Palavras-chave: *Brassica Oleracea*; Métodos de secagem; Farinhas alimentares

RESUMO

As couves (*Brassica* spp) são um vegetal amplamente cultivado e consumido entre as regiões do Norte de Portugal e Galiza e são um componente tradicional da Dieta Atlântica. O objetivo deste estudo foi produzir uma farinha alimentar rica nutricionalmente a partir da couve “Penca da Póvoa” (*Brassica oleracea* L. var. *Costata*), usando diferentes métodos de secagem: convecção (80°C-2h, com branqueamento) e liofilização. As análises físico-químicas estudadas foram: humidade, cinzas, proteína, hidratos de carbono, fibra e cor (L^* , a^* , b^*). A análise de variância (ANOVA) e o teste Tukey foram usados para determinar os valores significativamente diferentes ($p > 0,05$). Os resultados demonstraram que os métodos de secagem influenciam as propriedades físico-químicas da couve. Tal como esperado, as farinhas obtidas apresentaram um maior conteúdo em cinzas, proteína, hidratos de carbono e fibra ($p < 0,05$). Em relação ao conteúdo em hidratos de carbono, não se observaram diferenças significativas entre as farinhas obtidas por convecção e liofilização ($24,4 \pm 3,90\%$ e $25,1 \pm 3,97\%$, respetivamente). O método de secagem por convecção foi mais efetivo na concentração da proteína, apresentando valores superiores de $14,6 \pm 0,30\%$. Contrariamente, a liofilização conduziu a um conteúdo em fibra superior de $15,9 \pm 0,79\%$. A cor da couve foi influenciada pelos processos de secagem. O parâmetro da cor verde (a^*) e amarelo (b^*), nos dois processos de secagem, foram significativamente diferentes ($p < 0,05$). No parâmetro luminosidade (L^*), não se observaram diferenças entre a amostra fresca e a amostra seca por convecção. No entanto, através do parâmetro ΔE^a , verificou-se que o método de secagem por convecção influencia mais a cor do que a liofilização. A partir dos resultados concluiu-se que ambos os processos de secagem apresentam vantagens na melhoria das características nutricionais da couve obtendo-se, assim, farinhas com um grande potencial para o desenvolvimento de novos produtos de valor acrescentado em diferentes matrizes de alimentos.

1. INTRODUÇÃO

As couves (*Brassica* spp) são um vegetal amplamente cultivado e consumido entre as regiões do Norte de Portugal e Galiza, uma região a noroeste de Espanha, e são um componente tradicional da Dieta Atlântica [1]. O uso nutricional de vegetais e os seus potenciais benefícios à saúde são reconhecidos como importantes domínios de pesquisa. Além disso, do ponto de vista da sustentabilidade e segurança alimentar, são também considerados com um grande potencial no que diz respeito à produção de produtos de valor acrescentado, uma vez que o processamento de subprodutos e excedentes de couves são, geralmente, descartados [2, 3]. Inúmeras técnicas de processamento têm sido usadas para secagem de frutas e vegetais e as farinhas produzidas são usadas, particularmente, como produtos intermédios da indústria de bebidas, como aditivos alimentares funcionais melhorando o valor nutricional dos alimentos, como agente aromatizante (gelados, iogurtes, barras de frutas) ou também como corantes naturais [4]. Estas farinhas, de igual forma, servem também como ingredientes em massas, sopas entre outras formulações de produtos alimentares [4]. A qualidade de uma farinha é altamente dependente do método de secagem, bem como da composição, propriedades físicas e sistema de produção da respetiva matéria-prima [5].

O objetivo deste estudo foi produzir uma farinha alimentar rica nutricionalmente, a partir de couves, usando diferentes métodos de secagem: secagem por convecção e liofilização.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A espécie *Brassica*, conhecida como couve da “Penca da Póvoa” (*Brassica oleracea* L. var. *Costata*), foi fornecida por uma empresa da Póvoa de Varzim (UPN, Lda.) e mantida a 4°C até o momento da sua utilização. Antes de cada experiência, as couves foram desinfetadas, lavadas com água corrente e, finalmente, cortadas em pedaços menores. O branqueamento foi realizado com água quente a $95\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 min e logo de seguida, as couves foram arrefecidas em água fria (4 °C) [6]. As couves frescas foram submetidas a dois métodos de secagem diferentes: secagem por convecção forçada com ar quente (com branqueamento prévio) e liofilização. No caso de secagem por convecção, a amostra de couve foi espalhada uniformemente num tabuleiro perfurado na estufa a 80 °C, durante 2 h. No caso da liofilização, as amostras foram previamente congeladas a -80°C (SANYO, Japão) e posteriormente colocadas no liofilizador (ALPHA 1-2 LDplus, CHRIST, Alemanha) durante 48h. As amostras foram secas até um teor final de humidade de, aproximadamente, 10%. As análises físico-químicas realizadas, tanto para a amostra fresca como para as farinhas obtidas, foram: humidade, cinzas, teor de proteína, hidratos de carbono e fibra bruta e cor [7]. As análises foram realizadas em triplicado, exceto para a cor, onde se efetuaram 6 determinações. O teor de humidade foi determinado de acordo com o método AOAC 925.10: 1995. O conteúdo em cinzas foi determinado pelo método AOAC 935.39-B: 1995. A proteína foi determinada pelo método de Kjeldahl, AOAC 935.39-C: 1995. O conteúdo de hidratos de carbono foi determinado pelo método de DNS e o conteúdo em fibra bruta pelo método de filtro de fibra cerâmica, descrito pela AOAC 962.09: 1995. A cor das amostras foi medida com recurso a um colorímetro (Minolta Chroma Meter CR300, Japão) e ao sistema de cor CIE L* a* b*. Os dados foram

apresentados com a respetiva média \pm desvios padrão. A análise de variância (ANOVA) e o teste Tukey foram usados para determinar os valores significativamente diferentes a um nível de significância de $p > 0,05$, utilizando o Software SPSS (IBM, USA versão 25).

3. RESULTADOS

Os resultados da composição físico-química obtidos para a couve fresca e as farinhas alimentares obtidas após os métodos de secagem, estão descritos na Tabela 1. Os resultados demonstraram que os métodos de secagem influenciam as propriedades físico-químicas da couve. Tal como esperado, verificou-se que as farinhas obtidas por ambos os métodos de secagem apresentaram um maior conteúdo em cinzas, proteína, hidratos de carbono e fibra, quando comparadas com a couve fresca ($p < 0,05$). Verificou-se que o teor de humidade da couve fresca ($80,3 \pm 0,12\%$) diminuiu, após a secagem por convecção e liofilização, em cerca de 84% ($12,6 \pm 0,11\%$) e 92,5% ($5,37 \pm 0,20\%$), respetivamente. No que diz respeito ao teor de cinzas, a couve fresca apresenta um valor de $1,86 \pm 0,14\%$ e as farinhas obtidas, em ambos os métodos de secagem, apresentaram um valor superior, observando-se entre si diferenças significativas, sendo que a couve liofilizada apresentou um teor superior de $10,0 \pm 0,03\%$. Em relação ao conteúdo em hidratos de carbono, não se observaram diferenças significativas entre os dois métodos de secagem, por convecção e liofilização ($24,4 \pm 3,90\%$ e $25,1 \pm 3,97\%$, respetivamente), sendo estes valores superiores ao da amostra da couve fresca ($3,29 \pm 0,22\%$). No que diz respeito ao teor em proteína o método de secagem por convecção foi mais efetivo na concentração da mesma, apresentando valores superiores de $14,6 \pm 0,30\%$. Contrariamente, no que diz respeito ao conteúdo em fibra, a liofilização conduziu a um conteúdo superior ($15,9 \pm 0,79\%$) quando comparado com o método por convecção ($14,8 \pm 0,65\%$).

Tabela 1. Composição físico-química da couve “Penca da Póvoa”
Composição (g/100g massa seca)

| <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>Costata</i> | Humidade | Cinzas | Proteína | Hidratos Carbono | Fibra |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| Fresca | $80,3 \pm 0,12^a$ | $1,86 \pm 0,14^c$ | $1,52 \pm 0,07^c$ | $3,29 \pm 0,22^b$ | $2,51 \pm 0,08^c$ |
| Secagem por convecção | $12,6 \pm 0,11^b$ | $7,18 \pm 0,08^b$ | $14,6 \pm 0,30^a$ | $24,4 \pm 3,90^a$ | $14,8 \pm 0,65^b$ |
| Liofilização | $5,37 \pm 0,20^c$ | $10,0 \pm 0,03^a$ | $13,0 \pm 0,04^b$ | $25,1 \pm 3,97^a$ | $15,9 \pm 0,79^a$ |
| Letras iguais na mesma coluna indicam que os valores não são significativamente diferentes ($p > 0,05$) | | | | | |

Relativamente à cor, esta foi influenciada pelos processos de secagem, quando comparada com a amostra fresca. O parâmetro da cor verde (a^*) e amarelo (b^*), nos dois processos de secagem, foram significativamente diferentes ($p < 0,05$). No entanto, o parâmetro luminosidade (L^*), foi o único parâmetro onde não se observaram diferenças entre a amostra fresca e a amostra seca por convecção. No entanto, através do parâmetro ΔE^a , verificou-se que o método de secagem por convecção influencia mais a cor do que a liofilização, $18,1 \pm 3,48$ e $14,8 \pm 2,22$, respetivamente ($p < 0,05$).

Tabela 2. Parâmetros da cor $L^* a^* b^*$

| <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>Costata</i> | L^* | a^* | b^* | ΔE^a |
|---|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| Fresca | 38,9±2,40 ^a | -13,5±1,75 ^c | 22,2±3,69 ^a | |
| Secagem por convecção | 37,6±1,78 ^a | -1,49±0,37 ^a | 9,03±1,29 ^c | 18,1±3,48 ^a |
| Liofilização | 47,6±0,75 ^b | -6,77±0,51 ^b | 12,6±1,09 ^b | 14,8±2,22 ^b |
| Letras iguais na mesma coluna indicam que os valores não são significativamente diferentes ($p>0,05$) | | | | |
| $\Delta E^a = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$; $\Delta L = L - L_0$, $\Delta a = a - a_0$ e $\Delta b = b - b_0$ | | | | |

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados deste estudo concluiu-se que ambos os processos de secagem apresentam vantagens na melhoria das características nutricionais da couve obtendo-se, assim, farinhas com um grande potencial para o desenvolvimento de novos produtos de valor acrescentado em diferentes matrizes de alimentos.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto Nutriage-Soluciones avanzadas para un envejecimiento através de la nutrición en el marco de la euronutrición Galicia/Norte de Portugal. Projeto 0359_NUTRIAGE_1_E. INTERREG V A España Portugal (POCTEP).
Agradecimento à empresa UPN, Lda.

Referências

- [1] P Guallar-Castillón, A Oliveira, C Lopes, E López-García, F Rodríguez-Artalejo, *Atherosclerosis*, 2013, 226, 502–509.
- [2] C Batista, L Barros, A Carvalho, I Ferreira, *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49, 1208–1214.
- [3] Y Tanongkankit, N Chewchan, S Devahastin, *Food and Bioproducts processing*, 2012, 90, 541–548.
- [4] ME Camire, MP Dougherty, JL Briggs, *Food Chem*, 2007, 101 (2), 765–770.
- [5] MC Karam, J Petit, D Zimmer, EB Djantou, J Scher, *Journal of Food Engineering*, 2016, 188, 32–49.
- [6] Y Tanongkankit, N Chiewchan, S Devahastin, *Food and bioproducts processing*, 2012, 90, 541–548.
- [7] AOAC, 1995. *Official Methods of Analysis*, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD.

Efeito da secagem por convecção e liofilização nas propriedades físico-químicas de vegetais desidratados: pepino (*Cucumis sativus*) e curgete (*Cucurbita pepo* L.)

Ana Patrícia Sousa^{a,}, Manuela Vaz Velho^a, Rita Pinheiro^{a,b}*

^aInstituto Politécnico de Viana do Castelo, Viana do Castelo, Portugal

^bCentro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, Portugal

* apatriciasousa@estg.ipvc.pt

Palavras chave: Secagem; Liofilização; Pepino (*Cucumis sativus*); Curgete (*Cucurbita pepo* L.)

ABSTRACT

As frutas e os vegetais contêm uma grande variedade de fitoquímicos, que alegam exercer muitos benefícios à saúde. Esses produtos contêm alto teor de humidade (cerca de 80%) e deterioram-se em pouco tempo. Uma possibilidade de aproveitar estes produtos é através do processo de secagem, atribuindo-lhes valor acrescentado.

Com este trabalho, pretendeu-se avaliar o efeito dos métodos de secagem em estufa convectiva (60°C e 70°C) e liofilização, sobre as propriedades físico-químicas (textura, cor, humidade e cinzas) de pepino (*Cucumis sativus*) e de curgete (*Cucurbita pepo* L.), em comparação com o produto fresco. A análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foram utilizados para investigar diferenças significativas ($p < 0,05$) nos parâmetros. Os resultados demonstraram que o pepino e a curgete frescos apresentaram um teor de cinzas muito inferior ao dos vegetais desidratados, independentemente do tipo de secagem e temperatura. Verificou-se que se obteve aproximadamente 5% de humidade com secagem a 60°C, após 18h e 16h, para o pepino e curgete, respetivamente, e após 16h e 8h, a 70°C, para pepino e curgete, respetivamente. No final do processo de liofilização obteve-se um teor de humidade de, aproximadamente, 10% para ambos os vegetais. Em relação às características da textura, o processo de secagem diminuiu significativamente os valores de dureza para os vegetais ($p < 0,05$). Quanto aos parâmetros de cor, o processo de liofilização aumentou o brilho (L^*) do pepino ($p < 0,05$), não sendo verificadas diferenças significativas para esse parâmetro com o processo de secagem em estufa, para ambas as temperaturas. No caso da curgete foi verificado o comportamento oposto. Com este trabalho concluiu-se que os processos de secagem podem ser uma boa alternativa para obter um produto comercial de valor acrescentado, possibilitando o uso de excedente de produção vegetal, aumentando o seu prazo de validade e com menores custos de transporte.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os estudos revelam que as frutas e os vegetais contêm uma grande variedade de fitoquímicos, que alegam exercer muitos benefícios à saúde, incluindo a atividade antioxidante [1,2], sendo relativamente baixos em calorias [2]. O seu consumo tem demonstrado efeitos na proteção contra o risco de certas doenças, como o cancro e doenças cardiovasculares [3]. A quota de mercado para os frutos e legumes desidratados estão atualmente em crescimento para a maioria dos países do mundo [2,4]. A variedade de alimentos desidratados no mercado, com diferentes formas (p.e., snacks, sopas), assim como as exigências de qualidade e custo energético associado, torna necessário estudar o efeito da secagem sobre

as propriedades nutritivas e de textura desses produtos [5]. A secagem é um processo de conservação de alimentos no qual a remoção de água minimiza muitas das reações de deterioração. A sua remoção facilita o manuseamento do produto, a diminuição do seu peso e ainda a diminuição dos custos associados ao transporte [1,6,7]. Existem vários métodos de secagem, porém o tipo de processo pode provocar perdas de alguns compostos de importância funcional [8]. Os produtos alimentares podem ser desidratados por processos baseados na vaporização, sublimação, remoção de água por solventes, ou com a adição de agentes osmóticos. Os métodos de desidratação mais utilizados são os que têm como base a exposição do alimento a uma corrente de ar quente (a transferência de calor dá-se por convecção) [7]. Pretendeu-se com o estudo avaliar o efeito dos métodos de secagem em estufa convectiva (60°C e 70°C) e liofilização, sobre as propriedades físico-químicas (textura, cor, humidade e cinzas) de pepino (*Cucumis sativus*) e de curgete (*Cucurbita pepo* L.), em comparação com o produto fresco.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O pepino e a curgete foram fornecidos por uma empresa da Póvoa de Varzim (PAM, Lda), lavados, desinfetados e cortados em discos com 4.5mm de espessura. Os vegetais foram distribuídos em tabuleiros perfurados na estufa com convecção (Binder, Alemanha), e retiradas amostras ao fim de 6, 8, 14, 16, 18 e 24 horas, para a temperatura constante de 60°C e 70°C. No caso da liofilização, as amostras foram previamente congeladas a -80°C (Sanyo, Japão) e colocadas no liofilizador (Christ, Alemanha) durante 50 h, a 0,7 Pa. O teor de humidade e de cinzas foram determinados de acordo com o método gravimétrico AOAC 925.10 e AOAC 935.39-C respetivamente (AOAC,1995), na estufa regulada a 103 ± 2 °C (Heraeus, Alemanha) e na mufla a 550°C (Heraeus, Alemanha). A textura foi analisada recorrendo a um teste de penetração utilizando um texturometro (TA.XT2i Express Enhance, Inglaterra) com sonda (P/4). Para a cor utilizou-se o colorímetro (Minolta CR-300, Japão) e o sistema CIEL*a*b*. A análise ao teor de humidade e cinzas foi feito em triplicado, enquanto que para a análise da cor e da textura foram feitas 6 determinações. Os valores são apresentados com a respetiva média \pm desvio padrão. A análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foram usados para determinar os valores significativamente diferentes a um nível de significância de $p < 0,05$, utilizando o software SPSS (IBM, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Pepino

Relativamente à secagem em estufa, após 6h é possível reduzir o teor de humidade em $\approx 80\%$ e $\approx 90\%$, a 60°C e 70°C, respetivamente. Com a temperatura constante de 60°C, ao fim de 18h atinge-se, cerca de 5% de humidade ($5,61\% \pm 0,84\%$), mantendo-se o teor de humidade quase inalterado até 24h ($5,40\% \pm 0,30\%$). Com a temperatura constante de 70°C, ao fim de 16h são atingidos $5,88\% \pm 0,50$ de humidade, e um valor de $4,94\% \pm 0,42\%$ até 24h. Segundo a FAO [9], os vegetais desidratados de alta qualidade devem apresentar um teor de $\pm 5\%$ de humidade.

Na Tabela 1, são apresentados os valores obtidos para os parâmetros físico-químicos analisados para os três processos de secagem: secagem em estufa (60°C e 70°C) e secagem por liofilização. Foi alcançado um teor de humidade de $10,92\% \pm 0,50\%$ no final do processo de liofilização. O teor de cinzas aumentou significativamente com os processos de secagem ($0,27\%$ para $\approx 11\%$), não sendo verificadas diferenças significativas entre os diferentes processos de secagem ($p > 0,05$). A textura é significativamente influenciada ($p < 0,05$) pelos processos de secagem, verificando-se a diminuição da dureza. O processo de liofilização promove o aumento do brilho (L^*). O mesmo não se observa com a secagem em estufa ($p > 0,05$). Para os restantes parâmetros da cor, a^* e b^* , são verificadas diferenças significativas nas amostras ($p < 0,05$). O menor valor de a^* (amostras mais verdes) registou-se no produto fresco ($-6,77 \pm 0,91$) e o maior valor de a^* (amostras menos verde - acastanhadas) verificou-se na secagem a 70 °C ($3,57 \pm 0,40$). Verificou-se um aumento do valor de b^* (amostras mais amarelas) na secagem em estufa. De facto, estes resultados indicam que quanto maior o parâmetro b^* (mais amarelo) maior o parâmetro a^* (menos verde), que reflete a alteração da cor das amostras com o escurecimento enzimático (reação de *Maillard*) e o amarelecimento/cor torrado das amostras secas em estufa.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos analisados no pepino para os três processos de secagem.

| | Humidade (%) | Cinzas (%) | Dureza (N) | Cor (L^*) | Cor (a^*) | Cor (b^*) |
|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Fresco | 95,31 | 0,27 | 9,53 | 72,98 | -6,77 | 17,38 |
| | ($\pm 0,04$)a | ($\pm 0,02$)a | ($\pm 0,71$)a | ($\pm 3,12$)a | ($\pm 0,91$)a | ($\pm 0,43$)a |
| Estufa | 5,61 | 11,47 | 1,52 | 75,81 | 0,41 | 33,83 |
| 60°C (18h) | ($\pm 0,84$)b | ($\pm 0,07$)b | ($\pm 0,16$)b | ($\pm 3,61$)a | ($\pm 0,09$)b | ($\pm 4,35$)b |
| | 5,88 | 11,33 | 0,57 | 71,44 | 3,57 | 38,47 |
| Estufa | | | | | | |
| 70°C (16h) | ($\pm 0,50$)b | ($\pm 0,09$)b | ($\pm 0,13$)c | ($\pm 1,74$)a | ($\pm 0,40$)c | ($\pm 3,66$)b |
| | 10,92 | 11,46 | 1,62 | 83,73 | -5,38 | 15,21 |
| Liofilização | ($\pm 0,78$)c | ($\pm 0,27$)b | ($\pm 0,33$)b | ($\pm 1,54$)b | ($\pm 1,10$)d | ($\pm 1,18$)a |

Letras iguais na mesma coluna indicam que os valores não são significativamente diferentes ($p > 0,05$)

3.2 Curgete

Relativamente à secagem em estufa, verifica-se que após 6h o teor de humidade é reduzido cerca de 70% e 90%, a 60°C e 70°C, respetivamente. Com a temperatura constante de 60°C, atinge-se ao fim de 16h, cerca de 5% de humidade ($5,84\% \pm 0,66\%$), mantendo-se o teor de humidade quase inalterado até 24h ($5,43\% \pm 0,18\%$). Com a temperatura constante de 70°C, atinge-se ao fim de 8h $4,86\% \pm 0,25\%$ de humidade, e um valor de $3,69\% \pm 0,65$ ao fim de 24h. Na Tabela 2, são apresentados os valores obtidos para os parâmetros físico-químicos analisados para os três processos de secagem. O teor de humidade atingido no final do processo de liofilização foi de $9,16\% \pm 0,14\%$. O conteúdo de cinzas aumentou significativamente com os processos de secagem ($0,47\%$ para $\approx 10\%$), não sendo verificadas diferenças significativas para os diferentes processos de secagem ($p > 0,05$). Os processos de

secagem diminuem fortemente os valores de dureza ($p < 0,05$), no entanto não são verificadas diferenças significativas para os diferentes processos de secagem ($p > 0,05$). Os processos de secagem em estufa promoveram a diminuição da luminosidade, brilho, (L^*) da curgete (amostras mais escuras), não sendo verificadas diferenças significativas no parâmetro L^* com o produto fresco e liofilizado ($p > 0,05$). À semelhança do pepino, os resultados obtidos para os restantes parâmetros de cor, a^* e b^* , revelaram diferenças significativas nas amostras ($p < 0,05$).

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos analisados na curgete para os três processos de secagem.

| | Humidade (%) | Cinzas (%) | Dureza (N) | Cor (L^*) | Cor (a^*) | Cor (b^*) |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Fresco | 95,64 | 0,47 | 7,80 | 98,02 | 0,10 | 10,20 |
| | ($\pm 0,09$)a | ($\pm 0,02$)a | ($\pm 0,57$)a | ($\pm 1,58$)a | ($\pm 0,03$)a | ($\pm 0,64$)a |
| Estufa 60°C (16h) | 5,84 | 10,11 | 1,93 | 88,12 | -1,03 | 16,25 |
| | ($\pm 0,66$)b | ($\pm 0,16$)b | ($\pm 0,30$)b | ($\pm 1,73$)b | ($\pm 0,08$)a | ($\pm 0,69$)b |
| Estufa 70°C (8h) | 4,86 | 9,84 | 1,39 | 88,44 | -1,43 | 28,20 |
| | ($\pm 0,25$)b | ($\pm 0,11$)b | ($\pm 0,25$)b | ($\pm 1,06$)b | ($\pm 0,08$)b | ($\pm 1,17$)c |
| Liofilização | 9,16 | 9,57 | 1,73 | 98,15 | 0,01 | 15,17 |
| | ($\pm 0,14$)c | ($\pm 0,14$)b | ($\pm 0,23$)b | ($\pm 1,21$)a | ($\pm 0,01$)c | ($\pm 1,18$)d |

Letras iguais na mesma coluna indicam que os valores não são significativamente diferentes ($p > 0,05$)

4. CONCLUSÃO

Com o trabalho concluiu-se que os processos de secagem podem ser uma boa alternativa para a obtenção de um produto comercial com valor acrescentado, possibilitando o uso de produto excedentário, aumentando o seu prazo de validade e com menores custos de transporte.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto Internovamarket-food, financiado pelo INTERREG V-A Espanha-Portugal (POCTEP). Agradecimento à empresa Produção e Distribuição Hortícola do Litoral, Lda.

Referências

- [1] M. C. Karam, J. Petit, D. Zimmer, E. B. Djantou e J. Scher, Journal of Food Engineering, 2016, 188, 32-49.
- [2] M. A. Murcia, A. M. Jiménez-Monreal, L. García-Diz, M. Carmona, L. Maggi e M. MartínezTomé, Food and Chemical Toxicology, 2009, 47, 2103-2110
- [3] J. Mamelona, E. Pelletier, K. Girard-Lalancette, J. Legault, S. Karboune e S. Kermasha, Food Chemistry, 2007, 104, 1040-1047.
- [4] M. Zhang, J. Tang, A. Mujumdar e S. Wang, Trends Food Sci. Technol., 2006, 17 (10), 524-534.
- [5] M. K. Krokida, V. Karathanos, Z. Maroulis e D. Marinos-Kouris, Journal of Food Engineering, 2003, 59, 391-403

- [6] N. Sinha, Y. Hui, E. O. Evranuz, M. Siddiq e J.Ahmed, Handbook of Vegetables and Vegetable Processing, 1ª ed., 2011, Wiley-Blackwell: EUA.
- [7] Food Ingredients Brasil, 2013, 26, 58-71
- [8] M. Maskan, Journal of Food Engineering, 2001, 48, 169-175.
- [9] FAO, Dried Vegetables, 2007, 1-5

Assessment of functional properties and determination of pharmaceuticals in subcritical water extracts from two seaweeds

Ana P. Carvalho¹, Paula Paíga¹, Inês Ribeiro¹, Bruno Pedras², Rita Craveiro², Francisca Mano², Pedro Simões², Cristina Delerue-Matos¹, Clara Grosso^{1,*}

¹ REQUIMTE/LAQV, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Instituto Politécnico do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 431, 4249-015 Porto, Portugal.

² REQUIMTE/LAQV, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal¹

* claragrosso@graq.isep.ipp.pt

Keywords: Green extraction methods; Seaweeds; Neuroprotection; Contaminants

ABSTRACT

The main objective of this work was to characterize some functional properties (antioxidant capacity and anticholinesterase activity), from two edible seaweeds from the Portuguese coast, *Fucus vesiculosus* L. and *Codium tomentosum* stackhouse, in order to assess some of their potential health benefits. Subcritical water (SBW) extraction was performed with these seaweeds, using 3 steps of temperature. Antioxidant capacity tests performed were ABTS and ORAC, whereas the neuroprotective properties were assessed by the ability of the extracts to inhibit two enzymes, acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE). Extracts obtained using the highest temperature condition were the most promising ones.

In recent years, the presence and impact of pharmaceutical products detected in water environment has been a subject of concern. In order to guarantee that the extracts obtained were free of contaminants, the presence of pharmaceuticals belonging to different therapeutic classes was assessed by LC-MS/MS.

1. INTRODUCTION

Seaweeds are interesting marine organisms due to their nutritional, commercial and ecological importance. Apart from their nutritional importance as sources of minerals, proteins and omega-3 fatty acids (among others), they are also interesting sources of functional compounds such as metabolites with antioxidant and neuroprotective activities. These elements can exist at very different levels depending on the studied species, site of collection and season. Additionally, the extraction process and its conditions are also of utmost importance.

Consumption of food and beverages containing high amounts of bioactive compounds has been associated with the balance between reactive oxygen species and antioxidants status, which helps to minimize the oxidative stress in the body and to reduce the risks of diseases and aging. Moreover, several enzymes are involved in the pathogenesis of neurodegenerative diseases, and their inhibition is one of the mechanisms of action of the drugs available in the market to treat the patients. Therefore, searching for new natural bioactive compounds with the same mechanism of action is extremely important due to consumer preference for natural products.

Over the last years, increasing attention has been paid to study the presence and impacts of pharmaceuticals entering or detected in freshwater ecosystems [1]. By contrast, significantly less attention has been paid to understanding releases of pharmaceuticals from sewage and other routes into coastal environments and their potential marine impacts. There is now widespread recognition of the need for a cradle-to-grave stewardship of medicines for minimizing environmental exposure while promoting human and animal health [2]. Emerging pollutants present a new global water quality challenge with potentially serious threats to human health and ecosystems. Pharmaceuticals represent a major group of emerging pollutants found in freshwater and coastal waters.

This study aims to simultaneously evaluate the bioactivity of several SBW extracts from seaweeds, as well as to guarantee their safety in terms of potential contamination with pharmaceutical products.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Samples

The seaweeds (*Fucus vesiculosus* L. and *Codium tomentosum* stackhouse) were provided by Algaplus S.A. and used as obtained.

2.2. Reagents, Solvents and Materials

Enzymes, substrates, standards and other reagents for bioactivities were obtained from Sigma-Aldrich ((St. Louis, MO, USA). Methanol LC-MS and acetonitrile LC-MS grade were supplied by Scharlau (Barcelona, Spain), propanol LC-MS was obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), and formic acid (PA-ACS) was supplied by Carlo Erba (Rodano, Italy). Eighty-three pharmaceuticals, transformation products and metabolites belonging to different therapeutic classes, including non-steroidal anti-inflammatory drugs, analgesics, antibiotics, anorectics, anxiolytics, beta-blockers, laxatives, antidiabetic drug, antipsychotic, calcium channel blocker, fibrate lipid lowering agent, stimulants, lipid regulator and cholesterol lowering statin drugs, proton pump inhibitor, and psychiatric drugs were assessed. All compounds were of high purity grade ($\geq 98\%$). Stock solutions and working solution were prepared as described in the work of Paíga et al. [3] where the supplier company of each pharmaceutical is also mentioned. A mixture with the seventeen-isotope labeled internal standards was also prepared to be used for internal standard calibration.

2.3 Extraction

The SBW unit comprises a liquid pump, connected to a distilled water container, which delivers water through a high-pressure tube to a 270 cm³ stainless steel reactor, that is placed in an electric oven with temperature control. The pressure of the system is controlled by a back-pressure regulator (BPR). The aqueous stream leaving the reactor passes through a 15 μ m filter, its temperature and pressure being monitored, and later collected for analysis.

Each experiment was carried out with ca. 50 g of seaweed. The pressure was kept constant during the assay at 70 bar and the water flow rate at 10 mL/min. After the pressure reached 70

bar, the heating system was turned on, and the aqueous stream started to be continuously collected at the exit of the reactor. To assess the influence of the temperature on the efficiency of the SBW extraction of seaweeds, extract samples were collected at different ranges: 50 to 130 °C, 130 to 190 °C, and 190 to 240 °C.

The yield of seaweed extract was later calculated from the amount of extract obtained by lyophilizing the samples collected throughout a given assay, as yield of extract, % = (weight of extract) / (initial weight of seaweed) × 100.

2.4 Bioactivities

Bioactivities were tested with spectrophotometric assays. Antioxidant capacity was measured through the ORAC [3] and ABTS [4, 5] protocols. Acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) inhibitions were evaluated by a modified Ellman's method [6].

2.5 UHPLC-MS/MS analysis

Chromatographic analysis was performed on a Shimadzu Nexera UHPLC system (LCMS-8030, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) coupled to a triple-quadrupole mass spectrometer and operated in the electrospray ionization (ESI) mode. Chromatographic separation, chromatographic columns, and chromatographic conditions were chosen based on preceding works of the authors [7, 8].

3. RESULTS

3.1 Extraction and bioactivities

The influence of temperature on the extraction efficiency of SBW for the two studied seaweeds is shown in Table 1. It is clearly seen that the yield of extract obtained in each sample varied distinctly with the temperature as well as with the seaweed under study.

Table 1. Influence of temperature on the extraction of seaweeds with SBW.

| Sample | Temperature (°C) | Yield of extract (g/100 g seaweed) | |
|--------|------------------|------------------------------------|----------------------|
| | | <i>F. vesiculosus</i> | <i>C. tomentosum</i> |
| 1 | 50-130 | 25.6 | 11.1 |
| 2 | 130-190 | 12.7 | 7.7 |
| 3 | 190-240 | 7.1 | 43.9 |
| | Total | 45.4 | 62.7 |

Extracts obtained using condition 3 were the most promising ones in all bioactivities tested (Table 2). Furthermore, *C. tomentosum* revealed higher antioxidant capacity (in both assays), as well as anticholinesterase activity than *F. vesiculosus*.

Table 2. Antioxidant and anticholinesterase activities of seaweed extracts.

| Samples | ABTS ^a | ORAC ^b | AChE | BuChE |
|---------|-------------------|-------------------|------|-------|
|---------|-------------------|-------------------|------|-------|

| | | | | % inhibition | IC ₅₀ ^c | % inhibition | IC ₅₀ ^c |
|-----------------------|---|-----------|-----------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| <i>F. vesiculosus</i> | 1 | 47.1±0.9 | | 8.4±3.2 (5 mg/mL) | | 14.1±3.2 (5 mg/mL) | |
| | 2 | 32.1±0.6 | | 8.0±3.4 (5 mg/mL) | | 16.9±5.4 (5 mg/mL) | |
| | 3 | 82.1±0.0 | 292.7±8.2 | 67.4±3.8 (2.5 mg/mL) | 0.99±0.09 | 70.4±6.7 (2.5 mg/mL) | 1.25±0.22 |
| <i>C. tomentosum</i> | 1 | 3.2±0.1 | | 24.7±13.5 (1.26 mg/mL) | | | |
| | 2 | 57.8±1.2 | | 23.8±11.5 (1.25 mg/mL) | | | |
| | 3 | 104.8±1.8 | 687.2±1.7 | 76.0±3.4 (0.63 mg/mL) | 0.09±0.01 | | |

^a Values are expressed as mg AAE/g extract; ^b Values are expressed as µg TE/g extract; ^c Values are expressed as mg/ml extract.

3.2. Analysis of contaminants

The analytes were identified by the injection of the seaweed extracts in UHPLC-MS/MS with an ESI source using multiple reaction monitoring. Eight calibration points were used for the construction of the internal standard calibration curves. Linear regression analysis over the concentration ranges presented good fits ($r^2 \geq 0.99$). From the results, it can be concluded that none of the studied pharmaceuticals were detected in the two seaweed extracts.

4. CONCLUSIONS

Extracts obtained by SBW extraction using a range of temperatures between 190 and 240 °C were the most active ones in ORAC, ABTS, AChE and BuChE methods. These extracts were free of contaminants.

Acknowledgments

Projects UID/QUI/50006/2013-POCI/01/0145/FEDER/007265, IF/01332/2014/CP1255/CT0001, Norte-01-0145-FEDER-000011-RL1-QUALIFOOD, Sea_4_Brain_Food and POCI-01-0145-FEDER-030240 are acknowledged for the financial funding. The authors would also like to thank the EU and FCT for funding, in the frame of the collaborative international consortium REWATER financed under the ERA-NET CofundWaterWorks2015 Call. This ERA-NET is an integral part of the 2016 Joint Activities developed by the Water Challenges for a Changing World Joint Programme Initiative (Water JPI).

References

- [1] Hughes, S., P. Kay, L. Brown, Environ. Sci. Technol., 2012, 47, 661–677.
- [2] Daughton, C., Environ. Health Perspect., 2003, 111, 775.
- [3] Huang, D. et al., J. Agric. Food Chem., 2002, 50, 4437-4444.
- [4] Gião, M.S. et al., J. Sci. Food Agric., 2007, 87, 2638–2647.
- [5] Re, R. et al., Free Radic. Biol. Med., 1999, 26, 1231–1237.
- [6] Vinholes, J. et al., Food Chem., 2011, 129, 454-462.
- [7] Paíga, P. et al., Sci. Total Environ., 2019, 648, 582-600.
- [8] Paíga, P., L.H.M.L.M. Santos, C. Delerue-Matos. J. Pharm. Biomed. Anal., 2017, 135, 75-86.

AVALIAÇÃO DO pH NA TRANSFORMAÇÃO DO MÚSCULO EM CARNE BOVINA

Landum L.¹; Fernandes, I²; Ferro Palma, S.¹.

¹DTCA, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Beja, Portugal

²Matadouro da SAPJU CARNES, S.A, Beja, Portugal

sfpalma@ipbeja.pt

Palavras chave: Bem-estar animal, PSE, DFD,

RESUMO

A qualidade da carne é influenciada por vários factores, nomeadamente, a raça do animal, sexo, alimentação e sobretudo o manejo do animal. Por isso, o bem-estar animal influencia de modo fulcral a qualidade da carne. Animais sujeitos a stresse originam carne de pior qualidade e com valores de pH anómalos [1].

O bem-estar animal nos matadouros é um tema recente [2], o seu controlo constitui um factor essencial nas características finais da carne, com tradução na transformação do músculo em carne.

A ocorrência de uma rigidez cadavérica adequada e uma queda notória do pH são factores benéficos para a carne, pois o pH dito baixo (5,4-5,5) promove a inibição do crescimento microbiano e o ácido láctico formado potencia uma textura macia, em virtude da conversão do colagénio em gelatina [3].

O pH tem influência na conservação da carne e tem um papel decisivo na qualidade da carne, pois afecta características como cor, textura e suculência às quais os consumidores dão elevado ênfase

O trabalho foi desenvolvido no matadouro da SAPJU CARNES, S.A. As raças avaliadas foram vacas, Alentejanas, Cruzado de carne, Turino e Limousine.

As medições de pH foram realizadas aos 0 dias e 2 dias de abate, com o intuito de avaliar o pH na transformação do músculo em carne bovina.

A medição do pH foi realizada com um medidor de pH portátil (método potenciométrico) e efectuada na zona da vazia e do acém.

Com os resultados obtidos concluímos que nas raças Cruzado de Carne, Turino e Limousine existem carnes que poderíamos considerar DFD, segundo [4]. Nas vacas Cruzado de Carne, 6,4%, e nas vacas de raça Limousine 5,5%. A variação de pH ao longo das primeiras 48 horas é similar nas quatro raças.

As vacas Turino destacam-se em relação às outras raças por apresentar valores de pH mais baixos, tanto no acém como na vazia.

1. INTRODUÇÃO

Animais sujeitos a stresse pode originar carne de menor qualidade e com valores de pH anómalos [3]. Aspectos relacionado ao bem-estar e manejo do pré-abate, que envolvem stress e esforço despendido pelos animais nas ações de carregamento, transporte, descarga, além do período de descanso dos animais após o transporte, até ao momento do abate, apresenta grande influência na qualidade da carne [3]. No manejo pré-abate, o excesso de agressividade provoca não só o stresse dos animais, comprometendo o seu bem-estar, como tem influência negativa na qualidade da carne. O bem-estar animal de facto é um termo vasto que engloba o conforto físico e o conforto mental dos animais, assim as suas necessidades podem ser fisiológicas ou físicas e psicológicas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo teve como principal objetivo a medição de pH em cerca de duzentos e quarenta e um bovinos, com idades, raças, conformações e sexos diferentes.

Tabela 1 - Vacas avaliadas

| Alentejana | Cruzado de carne | Limousine | Turino |
|------------|------------------|-----------|--------|
| 23 | 94 | 57 | 52 |

A metodologia seguida para este trabalho foi a medição de pH nas carcaças entre os 0 e 4 dias após o abate. A medição do pH muscular de carcaças de bovino foi realizada com auxílio de um medidor de pH portátil de carne (método potenciométrico), da marca NWK e modelo, pH K21. Este método consiste em inserir o eletrodo, juntamente com a lâmina que o protege, no músculo onde se pretende medir. Este eletrodo tem a capacidade de registrar duas medições (pH1 e pH2), com registo de hora e data da sua realização.

No presente estudo as medições de pH foram realizadas na vazia e acém da carcaça

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos foram analisados raça a raça.

De acordo com o autor, [4] quando temos um pH superior a 6,5 consideramos ser uma carne DFD.

As vacas Alentejanas classificadas de O, ou seja, razoável e diferentes tipos de gordura.

Aos 0 dias de abate verifica-se que o pH se encontra entre os valores 5,82 na vazia e 5,96 no acém, o músculo acém têm um valor mais alto do que na vazia, isto deve-se a uma menor retenção de glicogénio. Após as 24 horas de abate o glicogénio vai baixar significativamente. Às 48 horas como já aconteceu o rigor mortis o pH vai baixar e dar início à maturação. Depois de analisados os dados da raça Alentejana, não existem carnes DFD.

Nos bovinos de raça cruzada de carne obtiveram-se classificações de O, P e R e gorduras de 2, 3 e 4. Para ser considerada uma carne de DFD ou PSE, basta um dos músculos, a vazia ou o acém não estarem dentro dos valores de pH esperados. Depois de analisados os dados das vacas Cruzados de Carne, consideramos que 6,4% são carnes DFD. Não foram encontradas carnes PSE.

O pH ao 0 dia encontra-se alto em ambos os músculos sendo mais alto no acém. Perante os autores [4] e [5] estes valores estão próximos de um pH de uma carne DFD, isto pode ser uma consequência do animal apresentar stresse e fadiga ao chegar ao matadouro, 24 horas após o abate o pH baixa ligeiramente, apesar do músculo da vazia já se encontrar inferior a 6, no músculo do acém não podemos dizer o mesmo, o pH continua alto (6,01), isto é uma consequência de existir maior teor de glicogénio num músculo do que outro. Nas 48 horas após o abate o pH baixa novamente, isto é uma consequência de já estar instalado o rigor mortis e a ter início a fase de maturação.

As vacas Turino abatidas, apresentaram uma classificação de O e P, ou seja, razoável e medíocre, a sua gordura varia entre 2 (magra) e 3 (média). Depois de analisados os dados das vacas Turino, consideramos que 31% são carnes DFD, não se detectaram carnes PSE.

O pH baixa logo nas primeiras 24 horas. Inicialmente aos 0 dias de abate as carcaças apresentam um pH superior a 6, isto pode ser consequência de os animais apresentarem algum stresse antes do abate. Após as 24 horas o pH baixa de 6,22 para 5,81 na vazia e no acém de 6,32 para 5,92, estes valores refletem com a quantidade de glicogénio presente no músculo no momento de abate ou ao stresse que o animal tinha. Passado as 24 horas após o abate é possível dizer-se que se atingiu o rigor mortis. Ao atingir o rigor mortis o pH vai descer novamente às 48 horas para

zonas de acidez devido à formação do ácido láctico que actua como um bacteriostático e que com a libertação das catepsinas, inicia-se a proteólise, responsável pela maturação, o que vai promover uma melhor tenrura e sabor à carne. O valor final do pH da carne influi a conservação e as propriedades tecnológicas da carne. Uma acidificação adequada da carne corresponde a valores de pH entre 5,4 e 5,8.

As vacas Limousine apresentaram uma classificação de O, P e R, ou seja, razoável, medíocre e boa. Quanto à gordura obtiveram valores de 2, 3 e 4, ou seja magra, média e gorda. Depois de analisados os dados da raça Limousine 5,5% são carnes DFD, não existiam carnes PSE.

O pH aos 0 dias é mais alto no músculo acém do que na vazia. Após as 24 horas do abate o pH vai diminuir, pois acontece o rigor mortis.

Podemos comparar as diferentes raças presentes neste estudo avaliando os valores médios de pH às 48 horas após o abate.

Tabela 2 - pH medido às 48 h do abate

| VACAS | pH 1 - Vazia | pH2 - Acém |
|------------------|--------------|------------|
| Alentejana | 5,73 | 5,90 |
| Cruzado de Carne | 5,76 | 5,89 |
| Turino | 5,63 | 5,80 |
| Limousine | 5,77 | 5,91 |

As carcaças das diferentes raças têm pH próximo uns dos outros, com exceção das vacas Turino que apresentam um pH mais baixo em ambos os músculos. Os valores de pH no músculo da vazia são sempre mais baixos do que no músculo acém, isto é derivado do tipo de músculos e da quantidade de glicogénio que fica retido no músculo antes do abate do animal. Por fim podemos afirmar que a maioria das carcaças apresentam um pH normal para carne.

4. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos podemos concluir que nas vacas de Cruzado de Carne, Turino e Limousine existem carnes que poderíamos considerar DFD, segundo o [4], sendo apenas necessário um dos músculos (vazia ou acém) terem um pH superior a 6,5. Nas vacas Cruzado de Carne, 6,4% eram consideradas DFD, nas vacas Turino foi onde se obteve uma maior percentagem, 31% e na raça Limousine 5,5%. A raça turino obteve uma percentagem muito alta, pelo que seria interessante avaliar como decorreu a carga e para o matadouro destes animais. As condições de transporte de curta ou longa duração, pode influenciar as normas do bem-estar animal e levar os animais a um estado de fadiga e stresse, afectando as reservas de glicogénio o que vai alterar os valores de pH na carne. Concluimos que a variação de pH ao longo das primeiras 48 horas é similar nas quatro raças. As vacas Turino destacaram-se em relação às outras, por apresentar valores de pH, tanto no acém como na vazia valores mais baixos. Com a realização deste trabalho concluimos que a SPAJU carnes, S.A, cumpre os requisitos estabelecidos no Regulamento (CE) N.1099/2009, o que conduz a valores de pH considerados normais na maioria das carcaças.

Agradecimentos

Os autores agradecem à SPAJU CARNES, S.A.

Referências

- [1] Arantes, S. (2014). *Importância do pH na carne*. Mestrado Integrado em Engenharia Biológica - Ramo Tecnologia Química e Alimentar. Minho: Universidade do Minho-Escola de Engenharia.
- [2] Regulamento (CE) nº 1099/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2009. Protecção dos animais no momento da occisão, Jornal Oficial da União Europeia, L303. Bruxelas.
- [3] Barbalho, P. C. (2007). *Avaliação de programas de treinamento em manejo racional de bovinos em frigoríficos para melhoria do bem-estar animal*. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- [4] López, N. *et al.* (2001). Tecnología de elaboración de productos cozido. In Martín Bejarano, S. (2001). *Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos* (Vol. II, Cap. 4). Plasencia (Cáceres): Martín & Macias.
- [5] Lawrie, R. A. (2005) *Ciência da carne*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 384p.

#10668

Optimization and development of analytical methods for the determination of new brominated flame retardants and polybrominated diphenyl ethers in chili peppers

Virgínia C. Fernandes^{a}, Ward Luts^{b*}, Cristina Delerue-Matos^a, Valentina F. Domingues^a*

^a REQUIMTE/LAQV, Instituto Superior de Engenharia, Instituto Politécnico do Porto, Rua Dr^o António Bernardino de Almeida, 431, 4200-072 Porto, Portugal.

^b Faculty of Engineering Technology, Hasselt University, KU Leuven, Belgium
vircru@gmail.com

*contributed equally to this study

Keywords QuEChERS; Flame retardants; GC-ECD; Chili peppers

ABSTRACT

Food safety has become a constant concern all over the world, leading healthcare institutions and governments of several countries to find ways to monitor production chains. Brominated flame retardants (BFRs) are mixtures of man-made chemicals that are added to a wide variety of products to make them less flammable. BFRs have raised great concerns for their persistence, bioaccumulation, and harm to human health. Consequently, the attention in monitoring BFRs is growing and the European Commission has adopted a recommendation (118/2014/EU). The contamination of BFRs in food samples results not only from the environment, but also during food processing or storage. For the first time, a simple, fast and cost-effective sample preparation method is proposed as extraction technique to determine 11 BFRs in Chili peppers samples. Different QuEChERS, and dispersive solid phase extract sorbent compositions were evaluated in terms of recovery and matrix effects. Gas chromatography (GC) coupled with an electron capture detector was used for the detection and the quantification of the BFRs. Matrix effects were studied and the LODs obtained were between 4.52-13.57 µg/kg and recoveries were calculated and varied between 21-149%, The repeatability is lower than 20%. No traces of BFRs were found in real samples.

1. INTRODUCTION

BFRs, such as polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and others emerging BFRs, have been used as additives in furniture, electronics, foams, building materials and textiles to reduce the risk of fire spreading. In the past decade, new regulations have been approved to phase out and ban classes (penta, octa, deca) of PBDEs [1], due to increasing evidence of their toxicity, persistency and other health and environment concerns. Thus, a novel FRs have been introduced in commercial formulations as a PBDE replacement to comply with fire protection guidelines. Contamination of food may result not only from the environment, but also during food processing, packaging and storage. A few studies have reported the presence of BFRs in packaged fresh food [2, 3]. The development of simple, rapid, selective and sensitive methodologies that allow the BFRs determination at very low levels constitutes a special

challenge. Hence, the present work reports the development and validation of a two steps method, using QuEChERS extraction followed by dispersive solid phase extraction (d-SPE) step for the analysis of BFRs in chili peppers (*Capsicum annuum* L.).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Samples and extract preparation

Capsicum annuum L. samples (packaged and storage in paper/plastic containers) were purchased from the north of Portugal markets. The samples were frozen at -18°C. The frozen samples were homogenized individually with a high-performance blender and stored at -18°C until analysis.

2.2. Sample preparation methodology

The methodology was based on the QuEChERS extraction (1ststep) and d-SPE (2ndstep) approach based on our previous studies [4-6].

Briefly, ~10 g of blended *Capsicum annuum* L. sample was weighed into a 50 mL Teflon centrifuge tube. Subsequently, 10 mL of the extraction solvent (acetonitrile) and the QuEChERS sorbents were added. The tube was mixed by hand and further vortexed for 1 minute. To finish the first step, the tube is centrifuged for 5 minutes at 4500 rpm. In 2ndstep, 1.5 mL of the supernatant obtained after the 1ststep was transferred to a 2 mL tube containing the d-SPE cleanup sorbents. The tube was mixed by hand, vortexed for 1 minute and centrifuged for 5 minutes at 4500 rpm. In the last step, 800 µL of the supernatant was transferred into a 1.5 mL vial. The sample was dried by exposing the sample to a flow of nitrogen gas and redissolved in n-hexane. After vortexing the sample, the extract was ready for GC analysis. Samples, without spiking, were analyzed in the optimized conditions.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The efficiency of the sample preparation methodology was evaluated in terms of recovery percentages of the target compounds. Different QuEChERS and cleanup sets were tested. The GC analysis using an electron capture detector (ECD) were developed. Figure 1 shows the chromatogram obtained with the best GC program of a 50 µg/L standard BFRs solution. Generally, the results showed that BFRs recovery percentages were between (21-149%) and the chromatograms were cleaner with the peaks well defined. However, the suppression matrix effects were observed for some of the BFRs.

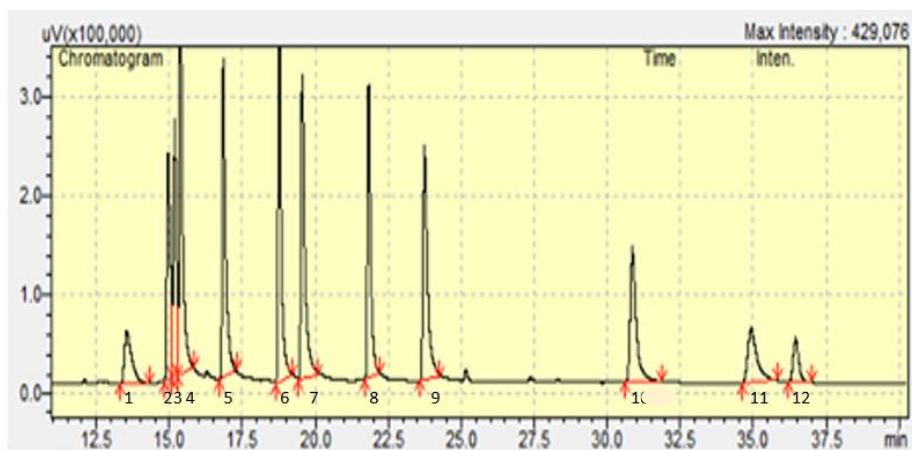


Figure 1: Chromatogram of the twelve tested BFRs of a 50 µg/L standard solution with (1) FRS-38N, (2) BDE-28, (3) FRS-18N, (4) FRS-48S, (5) BDE-100, (6) BDE-47, (7) FRS-41N, (8) BDE-154, (9) BDE-153, (10) BDE-183 and (11) FRS-37N.

After the optimization tests, the best conditions were selected and used to show the accuracy of the method. The analytical parameters were evaluated, including solvent and matrix-matched calibration curves, LODs and LOQs based on SANTE/11813/2017 recommendations. High coefficients of determination (>0.99) were obtained. The LODs values were in the range of 4.52-13.57 µg/kg. No BFRs peaks were observed in the chromatograms of the analyzed samples.

4. CONCLUSIONS

The extraction technique developed for *Capsicum annuum* L. was successful applied for 11 BFRs. No traces of BFRs were found in samples. This work contributes to the improvement of analytical methodologies on the BFRs analysis and in the field of monitoring food exposure to these contaminants.

Acknowledgements: The FCT and the FEDER, under Programme PT2020 (Project UID/QUI/50006/ 2013) and the project Qualidade e Segurança Alimentar – uma abordagem (nano)tecnológica (NORTE-01-0145-FEDER-000011) are acknowledged for the financial funding. V.C. Fernandes and M. Freitas are grateful to FCT for the Postdoc grant (SFRH/BPD/109153/2015) and PhD grant (SFRH/BD/111942/2015) respectively. Times New Roman tamanho 11.

References

- [1] Directive 2003/11/EC - Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (pentabromodiphenyl ether, octabromodiphenyl ether), Official Journal of the European Union, 2003.
- [2] A. Schecter, T.R. Harris, N. Shah, A. Musumba, O. Papke, Brominated flame retardants in US food, Mol. Nutr. Food Res. 52(2) (2008) 266-72.

- [3] J. W. Chang, C.-F. Hung, Y.-C. Hsu, Y.-T. Kao, C.-C. Lee, Polybrominated diphenyl ethers (PBDES) and hexa-brominated biphenyls (Hexa-BBs) in fresh foods ingested in Taiwan, *Environ. Pollut.* 220 (2017) 1180-1189.
- [4] V.C. Fernandes, V.F. Domingues, N. Mateus, C. Delerue-Matos, Organochlorine Pesticide Residues in Strawberries from Integrated Pest Management and Organic Farming, *J. Agric. Food Chem.* 59(14) (2011) 7582-7591.
- [5] V.C. Fernandes, V.F. Domingues, N. Mateus, C. Delerue-Matos, Pesticide residues in Portuguese strawberries grown in 2009-2010 using integrated pest management and organic farming, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19(9) (2012) 4184-4192.
- [6] V.C. Fernandes, M. Freitas, J.P.G. Pacheco, J.M. Oliveira, V.F. Domingues, C. Delerue-Matos, Magnetic dispersive micro solid-phase extraction and gas chromatography determination of organophosphorus pesticides in strawberries, *J. Chromatogr. A* 1566 (2018) 1-12.

Estudo dos efeitos da digestão gastrointestinal *in vitro* e fermentação colónica em extratos fenólicos e bioatividades de *Rosmarinus officinalis* L.

Rúbia C.G. Corrêa^{a,b}, Geferson A. Gonçalves^b, Lillian Barros^a, Maria Inês Dias^a, Ricardo C. Calhêla^a, Vanesa G. Correa^{b,c}, Adelar Bracht^b, Rosane M. Peralta^b, Isabel C.F.R. Ferreira^{a,*}

^aCentro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal

^bDepartamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil

* iferreira@ipb.pt

Palavras chave: atividade antioxidante; potencial antiproliferativo; efeito bactericida; estabilidade dos fitoquímicos; ácido rosmarínico

RESUMO

Foram estudadas potenciais perdas de fitoquímicos que ocorrem ao longo de passos sequenciais de digestão gastrointestinal *in vitro* e fermentação colónica de um extrato aquoso de alecrim. Os extratos iniciais (CI), digeridos (DE) e fermentados (FE) foram caracterizados em termos das suas propriedades bioativas e composição fenólica. O ácido rosmarínico, o principal componente do CI, sofreu a degradação mais significativa, verificando-se uma diminuição de 60%.

1. INTRODUCTION

Rosmarinus officinalis L. (Lamiaceae) é uma planta originária do Mediterrâneo, popularmente conhecida como alecrim [1]. Além do seu uso culinário, é também utilizada para fins terapêuticos desde a antiguidade [2]. A União Europeia considerou o extrato de alecrim como conservante alimentar seguro e eficiente, sendo o ácido rosmarínico (AR) o seu principal constituinte [3]. Os extratos ricos em AR não só possuem efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e hepatoprotetores [4], mas também previnem a oxidação em alimentos sem comprometer a aceitação sensorial dos mesmos, o que endossa o seu uso como ingrediente alimentar. No entanto, as informações sobre a estabilidade dos compostos bioativos no extrato de alecrim são escassas. O objetivo do presente trabalho foi estudar os efeitos dos compostos fenólicos ao longo dos processos mimetizados de digestão gastrointestinal *in vitro* e fermentação colónica de um extrato aquoso de alecrim, com especial interesse no AR. Os extratos de alecrim inicial (CI), digerido (DE) e fermentado (FE) foram caracterizados/comparados relativamente ao seu perfil fenólico e bioatividades (antioxidante, antibacteriana e antiproliferativa).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras e preparação dos extratos

As folhas secas de alecrim foram adquiridas num estabelecimento comercial (Maringá-PR, Brasil). Para obtenção do extrato inicial, 20 g de folhas foram colocadas em 100 mL de água sob agitação durante 1h. Para a preparação do extrato digerido foram usados 13 g de CI e a

simulação gastrointestinal envolveu passos sequenciais de digestão gástrica (solução de saliva artificial, α -amilase, fluido gástrico artificial, pH 1,2) e digestão intestinal (NaCl, KCl e líquido intestinal artificial, pH 6,0). Finalmente o extrato fermentado (FE) foi preparado a partir do DE num meio de tampão carbonato-fosfato com um inóculo obtido a partir de fezes de ratos Wistar machos (4762290915/2015-CEUA-UEM). Foi preparado um controlo para verificar a ausência de fenólicos na dieta dos ratos. Todos os extratos foram filtrados e liofilizado para análises posteriores [5-6].

2.2 Determinação e quantificação de compostos fenólicos

Os extratos liofilizados foram redissolvidos numa mistura de metanol:água (20:80, v/v) e caracterizados quanto ao seu perfil fenólico por HPLC-DAD-ESI/MSn. A identificação foi realizada comparando os tempos de retenção com os espectro UV-vis e de massa e com dados disponíveis na literatura. A quantificação foi feita a partir das áreas dos picos registados a 280 e 370 nm por comparação com as curvas de calibração obtidas de padrões comerciais [7].

2.1 Avaliação das bioatividades

Foram aplicados cinco métodos para avaliar a atividade antioxidante dos extratos: FRAP; ORAC [8]; DPPH; ABTS e TBARS [9]. A atividade antiproliferativa foi avaliada pelo ensaio de sulforrodamina B em 4 linhas celulares: MCF-7 (carcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) [10]. A citotoxicidade foi também avaliada em células de fígado de porco (células não tumorais, PLP2) [11]. A avaliação da atividade antibacteriana foi testada nos extratos dissolvidos em água usando o método de microdiluição e o ensaio colorimétrico de cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT) para determinar a concentração mínima inibitória (CMI) [12].

Foi efetuada uma análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste HSD de Tukey ($p = 0,05$) para os resultados da caracterização química. Os resultados da atividade antioxidante foram analisados por ANOVA, seguida de teste *post hoc* de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$), usando o programa IBM SPSS Statistics, versão 23.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três extratos apresentaram um perfil fenólico muito semelhante. Foram identificados dezasseis compostos, dez ácidos fenólicos (derivados do ácido cafeico e rosmarínico) e seis flavonoides (derivados da luteolina e da quercetina). Como era expectável, o ácido rosmarínico foi o principal componente encontrado em todas as amostras (6,9 mg/g em CI), seguido de ácido yunnaneico F, luteolina-*O*-glucurónido e ácido sagerínico.

A perda de compostos fenólicos mais pronunciada ocorreu ao longo da etapa de digestão gastrointestinal *in vitro*, após a qual foi observada uma redução de 26% no conteúdo de compostos fenólicos totais (FT). O AR presente em CI diminuiu quase 61% após a digestão, tendo-se observado uma menor redução para os outros compostos fenólicos. Após fermentação colónica, o CI apresentou uma redução adicional do conteúdo de FT de quase 21%, sendo que

nesta fase o AR sofreu uma nova degradação de 13,7%. O ácido sagerínico e a luteolina foram os compostos com as alterações mais pronunciadas, sofrendo uma depleção por volta de 42% e 55%, respectivamente. A principal causa da degradação de AR poderia ser explicada pela ação do extrato pancreático rico em esterases. Embora isso pareça uma explicação plausível, essa interpretação não pode ser considerada como definitiva, na medida em que não foi observado um aumento de ácido cafeico e derivados após esse processo.

De uma forma geral, a digestão gastrointestinal *in vitro* diminuiu a atividade antioxidante nos métodos DPPH, ABTS, FRAP, ORAC e TBARS (**Tabela 1**), embora o CI tenha apresentado valores de capacidade antioxidante promissores em todos os ensaios.

Tabela 1. Atividade antioxidante dos extratos avaliada por diferentes métodos (média \pm DP).

| | <i>Extrato inicial</i> | <i>Extrato digerido</i> | <i>Extrato fermentado</i> |
|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| DPPH EC ₅₀ (μg/mL) | 14,9 \pm 0,5 ^a | 20,1 \pm 0,5 ^b | 20,0 \pm 0,2 ^b |
| ABTS EC ₅₀ (μg/mL) | 6,5 \pm 0,3 ^a | 7,9 \pm 0,3 ^b | 8,0 \pm 0,4 ^b |
| FRAP mM TE/mg extrato | 2,5 \pm 0,3 ^a | 1,7 \pm 0,1 ^b | 1,8 \pm 0,2 ^b |
| ORAC mM TE/mg extrato | 9,1 \pm 0,5 ^a | 8,2 \pm 0,6 ^a | 5,54 \pm 0,04 ^b |
| TBARS EC ₅₀ (μg/mL) | 260 \pm 7 ^a | 369 \pm 27 ^b | 554 \pm 16 ^c |

Em cada linha, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significantes (p<0.05).

O CI e DE não apresentaram qualquer atividade antiproliferativa, no entanto, FE exibiu uma atividade antiproliferativa na linha celular HeLa (GI₅₀ = 116 μg/mL). Considerando que os compostos fenólicos sofreram reduções significativas ao longo dos passos de digestão e fermentação, estes podem não ser os responsáveis por esta bioatividade. Deverá ser também considerada a hipótese de que a microbiota fecal que transformou o extrato durante o processo de fermentação *in vitro* poderia desempenhar um papel na bioatividade.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana (valores de CMI, mg/mL) dos extratos de alecrim.

| | <i>Extrato inicial</i> | <i>Extrato digerido</i> | <i>Extrato fermentado</i> |
|-----------------------------------|------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Bactérias Gram-negativo | | | |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 2,5 | 5 | 20 |
| <i>Escherichia coli</i> ESBL | 5 | 5 | 5 |
| <i>Escherichia coli</i> | 5 | 5 | 5 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 20 | 20 | 20 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL | 10 | 10 | 10 |
| <i>Morganella morganii</i> | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 20 | 20 | >20 |
| Bactérias Gram-positivo | | | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 5 | 10 | 10 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 1,25 | 0,625 | 5 |

| | | | |
|------------------------------|-------|------|------|
| MRSA | 0,625 | 1,25 | 1,25 |
| MSSA | 0,625 | 1,25 | 1,25 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1,25 | 1,25 | 2,5 |

Nenhum dos extratos apresentou toxicidade na cultura primária PLP2, sendo que os valores de GI₅₀ obtidos foram todos superiores à máxima concentração testada (400 µg/mL). Esta ausência de citotoxicidade aqui verificada é muito importante, considerando a potencial aplicação de CI em sistemas alimentares.

Relativamente à atividade antibacteriana (**Tabela 2**), CI e DE revelaram-se moderadamente eficazes contra o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e sensível à meticilina (MSSA) e também contra *Listeria monocytogenes*. FE revelou-se também moderadamente eficaz contra o crescimento de MRSA e MSSA. É importante mencionar que as estirpes bacterianas são multirresistentes e que por isso apresentam uma resistência ao perfil antibiótico muito superior às estirpes ATCC [12].

4. CONCLUSÃO

Atendendo à bioatividade relevante exibida pelo extrato aquoso de *R. officinalis* rico em ácido rosmarínico, os resultados aqui descritos indicam a sua potencial utilização como um aditivo alimentar, seja como conservante e/ou ingrediente funcional. A fim de evitar perdas fitoquímicas que comprometam a sua eficácia e funcionalidade, a microencapsulação deste extrato deveria ser estudada em trabalhos futuros de forma a garantir a biodisponibilidade dos compostos bioativos.

Agradecimentos

À FCT e FEDER sob o programa PT2020 pelo apoio financeiro ao CIMO (UID/AGR/00690/2013) e contratos de L. Barros e R. Calheta. FEDER-Interreg Espanha-Portugal (0377_Iberphenol_6_E). Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnologia (CNPq) pelo contrato de R.C.G. Corrêa (167378/2017-1), e apoios a R.M. Peralta (307944/2015-8) e A. Bracht (304090/2016-6).



Referências

- [1] JM Andrade, C Faustino, C Garcia, et al., Future science OA, 2018, 4, FSO283.
- [2] GA Gonçalves, AB de Sá-Nakanishi, JF Comar, et al., Food & Function, 2018, 9, 1465–1474.
- [3] European Food Safety Authority (EFSA), EFSA Journal, 2008, 721, 1-29.
- [4] M Villalva, L Jaime, E Aguado, et al., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66, 1167-1174.
- [5] VG Correa, GA Gonçalves, AB de Sá-Nakanishi, et al., Food Chemistry, 2017, 237, 453-460.
- [6] S Karppinen, K Liukkonen, AM Aura, et al., Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000, 80, 1469-1476.
- [7] Bessada, S. M., Barreira, J. C. M., Barros, et al., (2016), Industrial Crops and Products, 2016, 89, 45–51.

- [8] EA Koehnlein, EM Koehnlein, RCG Corrêa, et al. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2016, 67, 614-623.
- [9] RCG Corrêa, AHP de Souza, RC Calhelha, et al. *Food & Function*, 2015, 6, 2155-2164.
- [10] L Barros, E Pereira, RC Calhelha, et al., *Journal of Functional Foods*, 2013, 5, 1732-1740.
- [11] RM Abreu, ICFR Ferreira, RC Calhelha, et al., *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 46, 5800-5806.
- [12] MI Dias, L Barros, P Morales, et al., *Food & Function*, 2016, 7, 4523-4532.

Determination of benzoic acid and sorbic acid in foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV detection

João Costa^a, Celeste Serra^a, Elsa Vasco^{b,*}

^a Chemical Engineering Department, High Institute of Engineering of Lisbon, Lisbon, Portugal

^b Food and Nutrition Department, National Health Institute Dr. Ricardo Jorge, Lisbon, Portugal

* elsa.vasco@insa.min-saude.pt

Keywords: benzoic acid; sorbic acid; HPLC; foodstuffs; food preservatives.

ABSTRACT

Benzoic and sorbic acids are two food additives used to preserve food products by inhibiting microorganism growth. EFSA and FDA recognized both substances as being safe to consumers, however there are some concerns arising from their wide occurrence in food, cosmetics and pharmaceutical products, that can lead to an increase of the daily intake and subsequent risk of exceeding the acceptable daily intake (ADI). That said, occurrence data through exposure assessment studies are essential to ensure consumer safety.

In this study, 23 food products (soft drinks, fruit juices, quince jams, yogurts, sauces, and bakery and cake products) commercially available in the market, were evaluated using a validated HPLC method with UV detection based on European Standard 12856.

Benzoic and sorbic acids were found in concentrations ranging from 94 to 824 mg kg⁻¹ or mg L⁻¹ and 91 to 1298 mg kg⁻¹ or mg L⁻¹, respectively. All samples were within the limits permitted by the legislation.

1. INTRODUCTION

Benzoic acid (BA), sorbic acid (SA) and their sodium and potassium salts (benzoates and sorbates), are commonly used food preservatives as they prevent the growth of bacteria, yeast and moulds [1].

BA inhibits bacterial development, having greater activity for acidic food products (pH ≤ 4.5), like beverages and sauces. Its sodium salt is preferably used due to its greater solubility in water. This preservative can be found in nature in fruits, in spices and in dairy products as a by-product of microbial degradation of hippuric acid [2]. BA exhibits low toxicity, because it is absorbed from the gastrointestinal tract and rapidly metabolized and excreted in urine within 24 hours. However, some concerns arise from studies that revealed some adverse effects, such as metabolic acidosis, hyperactivity in children and allergic reactions in humans and animals [3-5]. In addition, there are reports that refer the formation of benzene in beverages due to the reaction between BA and ascorbic acid [6]. Its acceptable daily intake (ADI) value of 0-5 mg kg body weight⁻¹ day⁻¹ was established by the European Scientific Committee on Food (SFC).

SA is an antifungal preservative against moulds and yeast being used for food products of higher pH (pH ≤ 6.5). Toxicologically, SA is an unsaturated fatty acid and therefore is

metabolized by β -oxidation pathway [3]. The SFC established an ADI value of 0-25 mg kg body weight⁻¹ day⁻¹ for this food additive.

In order to ensure consumer safety, reliable analytical methods are crucial to identify and quantify these substances, and estimate intake values.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Reagents and instrumentation

BA ($\geq 99.9\%$) and SA ($\geq 99.9\%$) were purchased from Merck (New Jersey, USA). *Carrez* solutions were prepared with potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate and zinc sulphate heptahydrate, purchased from Merck. The binary mobile phase was constituted by HPLC grade acetonitrile and a buffer of potassium phosphate monobasic, both from Merck. All standards and sample solutions were prepared with water type 1 (18.5 M Ω , 25°C), from Milli-Q system. Samples were filtered using PES membrane syringe filter (25 mm, 0.45 μ m), from VWR (Pennsylvania, USA). Chromatographic separations were performed on a Grace (Columbia, USA) C18 analytical column (250 x 4.6 mm, 5 μ m).

HPLC analyses were carried out on a WATERS (Massachusetts, USA) Alliance e2695 separation module and a PDA detector system. Data acquisition and instrument control were performed using Empower software. A pH meter 780 from Metrohm (Herisau, Switzerland) was used to adjust the pH of the mobile phase. All samples and mobile phases were dissolved/degassed using a Branson 3510 sonicator, from VWR. Solid samples were homogenized using two knife mills GRINDOMIX GM 200 and GM 300 from Retsch (Haan, Germany).

2.2 Standard solution preparation

Standard stock solutions were prepared by weighing approximately 50 mg of BA and SA and dissolving them in a 50 mL volumetric flask with 5 mL of acetonitrile and 45 mL of water. From the standard stock solutions, a dilution series of six concentration points (4, 10, 16, 24, 32 and 40 μ g mL⁻¹) was performed to prepare the calibration standard solutions.

2.3 Samples and sample solution preparation

A total of 23 samples comprising soft drinks and beverages, quince jam, dairy products, emulsified and non-emulsified sauces, bakery and pastry products were purchased from retailers around Lisbon. Not all samples had the preservatives listed on their label but were analyzed to confirm their absence.

For liquid samples, an aliquot of 10 mL were transferred to a 100 mL volumetric flask containing 50 mL of water. To the previous solution, 2 mL of *Carrez* solution I and 2 mL of *Carrez* solution II were added. The solution was vigorously shaken and allowed to stand for

10 minutes and made up to volume with water. Carbonated beverages were sonicated for 30 minutes to remove dissolved gases.

All solid and semi-solid matrices were homogenized in a knife mill. Then, 10 g of each sample was weighted to a 100 mL volumetric flask containing 50 mL of water. To improve the sample dissolution, an ultrasonic bath step at 40°C was performed for 20 minutes. After cooling down, the same procedure for the liquid samples was carried out.

All sample solutions were filtered before transferred to the autosampler vials.

2.4 Analytical method

The analytical method used in this study was previously validated and is based on EN 12856. A gradient elution method was performed to detect and quantify other food additives present in the samples. Chromatographic separations were achieved within 55 min at a flow rate of 1.0 ml min⁻¹ and column temperature of 37 °C. The injection volume was 20 µL for standards, and 10-20 µL for samples (to bring analyte concentration within the range of the method). The binary mobile phase was composed of phosphate buffer 0.0125 mol L⁻¹ pH 3.5 and acetonitrile. Analytes detection was made at 220 nm and external standard method was used for absolute quantification.

3. RESULTS AND DISCUSSION

All samples were analyzed in duplicate, and a third sample was prepared and spiked to perform recovery studies.

The results obtained are presented in Table 1 in terms of range of concentration for each class of food product, with the respective maximum permitted level (MPL), according to the European regulation.

Table 1. Range of concentration of BA, SA or BA+SA obtained for all food samples and MPLs.

| | Range (mg kg ⁻¹) | | MPL (mg kg ⁻¹) | | |
|--|------------------------------|------------|----------------------------|------|-------------------|
| | BA | SA | BA | SA | BA+SA |
| Soft drinks and beverages ¹ | 94 - 118 | 91 - 161 | 150 | 300 | 150+250 |
| Quince jams | 338 - 824 | 342 - 491 | NA ² | NA | 1500 |
| Dairy products ¹ | ND ³ | 97 - 117 | NA | NA | 300 |
| Non-emulsified sauces | 394 | 304 - 641 | NA | NA | 1000 |
| Emulsified sauces | ND | 671 - 1217 | NA | 2000 | NA |
| Bakery products | ND | 1298 | NA | 2000 | NA |
| Pastry products | 105 | 175 | NA | NA | 1500 ⁴ |

¹ Concentration of liquid samples and their MPLs are presented in mg L⁻¹

² NA – Not applicable

³ ND – Not detected

⁴ In Commission Regulation 1129/2011 it is stated a maximum limit of 1500 mg kg⁻¹ for the combination of benzoates, sorbates and parabens

Soft drinks and beverage samples presented lower levels of both preservatives. No sample has overlapped the MPLs of 300 mg L⁻¹ and 150 mg L⁻¹ for SA and BA, respectively, or 250+150 mg L⁻¹ when used in combination. Lino and Pena, 2010, did an extensive assessment study for the presence of food sweeteners and preservatives on traditional soft drinks and soft drinks based on mineral waters [7]. The present work showed results like this previous study. Yoghurt samples revealed the presence of both substances at low concentration and lower than the MPL of 300 mg L⁻¹ of SA and BA.

Quince jam samples proved to have more complex matrices resulting in more heterogeneous results regarding BA. Comparing the results to those obtained for Ferreira *et al.*, 2000, the same outcome was verified [8]. All samples have BA only and at a concentration lower than the MPL of 1500 mg kg⁻¹.

Regarding emulsified and non-emulsified sauces all concentrations were within the MPLs of 2000 mg kg⁻¹ of SA and 1000 mg kg⁻¹ of BA. However, one sample presented both BA and SA, a situation that is not predicted in the legislation.

The pastry sample showed a reduce concentration of both preservatives when compared to the MPL of 1500 mg kg⁻¹.

Bakery products have the greatest amount of SA equal to 1298 mg kg⁻¹ but within the MPL of 2000 mg kg⁻¹.

Recovery values were between 93% and 105% for BA and 93% and 116% for SA at spiked levels of 50% of the MPL.

4. CONCLUSIONS

The method used in the present work has proved to be suitable for a wide variety of food matrices.

Of the 23 samples analyzed, all were within the limits imposed by Portuguese legislation, and the absence of both preservatives in samples whose label did not mention their presence was also confirmed.

Aknowledgements

This study was supported by Project MONITADITIVOS (INSA), Portugal.

References

- [1] F. Mota, I. Ferreira, C. Cunha, M. Beatriz, P. Oliveira, Food Chemistry, 2003, 82, 469-473.
- [2] R. Chipley, Antimicrobials in Food, 3rd Ed., 2005, CRC Press, USA.
- [3] S. Tfouni, M. Toledo, Food Control, 2002, 13, 117-123.
- [4] K. Rowe, Journal of Paediatrics and Child Health, 1988, 24, 143-147,
- [5] Y. Wen, X. Zhang, Y. Wang, W. Wang., Analytica Chimica Acta, 2007, 577, 62-67.
- [6] Z. Mazdeh, F. Aftabdari, Z. Moradi-Khatoonabadi, M. Shaneshin, P. Torabi, M. Shams Ardekani, M. Hajimahmoodi, Food Additives & Contaminants: Part B, 2014, 7, 115-119.
- [7] C. Lino, A. Pena, Food Chemistry, 2010, 121, 503-508.

[8] O. Ferreira, E. Mendes, P. Brito, A. Ferreira, Food Research International, 2000, 33, 113-117.

Evaluation of natural extracts as potential enzymatic browning inhibitors

Cindy Dias ^a, Ana Amaro ^a, Ângelo Salvador ^{b, c}, Sílvia Rocha ^c, Armando Silvestre ^b, Nélson Isidoro ^d, Manuela Pintado ^{a, *}

^a Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa/Porto, Porto, Portugal

^b CICECO e ^c QOPNA, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Portugal

^d Cooperativa Agrícola dos Fruticultores do Cadaval, COOPVAL, Cadaval, Portugal

* mpintado@porto.ucp.pt

Keywords: Phenolic compounds, Antioxidants, Fruit browning, Oxidative enzymes

ABSTRACT

Enzymatic browning in fruits represents a difficult problem for Food Industry, especially with recent restrictions in the use of synthetic antioxidants. It is often associated with undesirable off-flavors and negative effects on taste and nutritional value. This physiological disorder is mainly due to the oxidation of natural phenolic compounds into quinones that are polymerized to brown pigments by polyphenol oxidase (PPO). Peroxidase (POX) is also alleged to be related to browning development, by inducing H₂O₂ oxidation of phenolic compounds. Prevention of browning reactions, catalyzed by these enzymes, has traditionally been accomplished by various chemicals, as ascorbic and citric acids. Partial control of this disorder can be obtained with the application of antioxidants, which compete with common substrates for the enzymatic activity. This study assessed the potential of natural extracts, with antioxidant properties (such as soy protein concentrate, extracts of apple byproduct and olive leaves) as novel enzymatic browning inhibitors. The antioxidant capacity was assessed by the radical scavenging assay using ABTS⁺ radical. The natural extracts inhibitory effect on PPO and POX activity was evaluated using a spectrophotometric assay by reaction of the natural extracts with the pure enzymes, using catechol and guaiacol as substrates, respectively. The present study demonstrated that olive leaves had the highest antioxidant capacity (2.688 ± 0.006 mg/mL TEAC equivalent), however, apple byproduct was the most effective on PPO and POX activity inhibition. The study has practical implications in generating novel natural extracts with potential application as anti-browning agents.

1. INTRODUCTION

It is of outmost importance the preservation of quality during fruit postharvest storage, especially for its competitiveness, allowing extension of marketing and maintenance of high selling price periods. However, there are several diseases affecting organoleptic and physiologic properties of horticultural commodities [1]. Enzymatic browning is a widespread reaction occurring in most fruits and vegetables, leading to faster quality deterioration and shorter shelf-life. In fact, this oxidative reaction is the second most important cause of food deterioration and represents a difficult problem for Food Industry, especially with recent

restrictions in the use of synthetic antioxidants [2]. It is often associated with undesirable off-flavors and negative effects on taste and nutritional value and it is mainly due to the enzymatic oxidation of natural phenolic compounds, namely monophenols, into *o*-diphenols and *o*-diphenols into quinones, which undergo further non-enzymatic polymerization, resulting in the formation of brown pigments [3,4]. The main oxidative enzymes responsible for browning are polyphenol oxidase (PPO, EC 1.10.3.1) and peroxidase (POX, EC 1.11.1.7). Therefore, the attempt to control these enzymes activity is crucial for the preservation of postharvest fruits and vegetables. However, this inhibition has traditionally been accomplished by use of various chemical compounds. Antioxidant solutions have been traditionally employed in the Food Industry, mainly as enzymes inhibitors, competing with common substrates for the enzymatic activity. Ascorbic acid and its derivatives and sulfites has been found to be the most effective in controlling browning [3]. Natural alternatives to these costly inhibitors would be desirable. Moreover, there is a rising interest in natural antioxidants as bioactive components of foods.

Phenolic compounds are naturally present in all plant material, including food products of plant origin, and they have been reported to have multiple biological effects, including antioxidant activity and potential as oxidative enzyme inhibitors. The antioxidant activity of phenolics is mainly due to their redox properties, which allow them to act as reducing agents, hydrogen donors, and singlet oxygen quenchers [5].

In this study, the potential antioxidant and enzyme inhibitory activities of natural extracts soy protein concentrate, apple byproduct and olive leaves, rich not only in phenolic compounds but also in triterpenic acids and amine groups, were investigated.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Chemicals and extracts

The commercial digestive-enzymes, Peroxidase from Horseradish and Tyrosinase from mushroom, ABTS and potassium persulfate were purchased from Sigma-Aldrich. The soy protein was purchased from market place, olive leaves collected from nature and apple byproduct provided by INDUMAP- Fruit's industrialization (Portugal).

2.2 Methods

Extracts preparation

Olive leaves extract was prepared by reflux during 1 h 30 min with H₂SO₄ at 10% (m/v), followed by filtration, neutralization with NaOH and extraction with C₄H₈O₂. Apple byproduct extract was obtained by MeOH:CH₂O₂ (80:20).

Antioxidant activity

The antioxidant capacity was assessed by the radical scavenging assay using ABTS⁺ radical [6]. Briefly, ABTS radical cation was produced from the reaction of 7 mM 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) and 2.45 mM potassium persulfate, after incubation, at room temperature in dark, for 16 h. The ABTS

solution was diluted with water to an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm. After the addition of 1.0 mL ABTS solution to 10 μ L of sample, the mixture absorbance reading was performed after 6 min. Ascorbic acid was used as standard (TEAC equivalent).

Enzymatic activity

Prior to the natural extracts inhibitory effect measurement on PPO and POX activity, the concentrations of enzyme, substrate and reaction time were optimized. The method was performed using a spectrophotometric assay (using a Thermo Scientific Multiskan GO) measuring at 420 and 470 nm, respectively, the reaction of the natural extracts with the pure enzymes, using catechol and guaiacol as substrates, respectively. Then, the enzyme activity in each inhibition reaction was determined using SkanIt™ Software version (4.1). The % of enzyme activity inhibition was calculated using control (i.e., substrate without inhibitor) as the highest enzyme activity (i.e., 0 % of inhibition). All the concentrations were determined and optimized based on previous works (data not shown).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Antioxidant activity and enzymatic activity

According to Figure 1, olive leaves extract, at 25 mg.mL^{-1} presented the highest antioxidant activity ($2.688 \pm 0.006 \text{ mg.mL}^{-1}$ TEAC equivalent), followed by soy protein, which at a higher concentration (47.62 mg.mL^{-1}) showed an antioxidant activity of $0.44 \pm 0.02 \text{ mg.mL}^{-1}$ TEAC equivalent, and apple byproduct extract with an activity of $0.09 \pm 0.02 \text{ mg.mL}^{-1}$ TEAC equivalent at 16 mg.mL^{-1} .

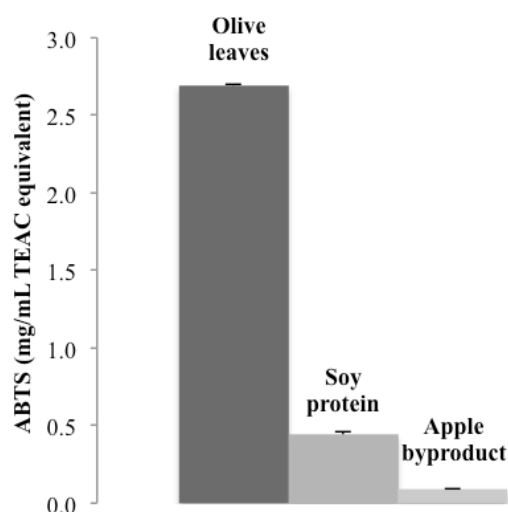


Figure 1. Antioxidant activity method. Values are the average of three analytical replicates.

high the ABTS⁺ average of three

Validating its higher antioxidant activity, olive leaves extract demonstrated to be rich on tocopherol (data not shown) whose primary function is as an antioxidant. Regarding soy

protein and according to the literature, it is not expected to show a high ABTS scavenging activity unlike apple byproduct, which is mainly constituted by chlorogenic acid, procyanidins and epicatechin, strong antioxidants. The low antioxidant activity of observed in apple byproduct extract may be attributed to the low concentration used in this study.

Table 1 shows, as expected, ascorbic acid, at a concentration of 5 mM, was effective in reducing both enzymes activity. The results also show that only apple byproduct extract was capable of reducing PPO activity, which can be explained by the presence of chelating agents, that can reduce the this enzyme activity. In agreement with the antioxidant activity results, olive leaves extract proved to be quite effective on POX inhibition activity, comparing to ascorbic acid. Concerning soy protein, it inhibited POX activity by ca. 20%. It is possible that there are components acting as inhibitors of enzyme activity which may not be measured using ABTS method. A thorough investigation of antioxidant components of the various extracts is being conducted.

Table 1. Different extracts and soy protein % of inhibition relatively to the control. Results are shown in mean of three replicates \pm SD

| Enzyme | Ascorbic acid | Olive leaves | Soy protein | Apple byproduct |
|--------|------------------|------------------|------------------|-----------------|
| PPO | 100 \pm 2.57 | 0 | 0 | 11.6 \pm 3.12 |
| POX | 63.53 \pm 0.75 | 44.81 \pm 1.48 | 21.49 \pm 2.34 | 60 \pm 1.16 |

4. CONCLUSIONS

The present study demonstrated that leaves from olive tree showed the highest values of antioxidant activity within the natural extracts. It is important to highlight the inhibitory effect of apple byproduct on PPO, despite the low antioxidant activity. The present study has practical implications in generating novel natural extracts with potential application as anti-browning agents.

Acknowledgements

This work is a result of the project “ReStoragePear”, supported by COMPETE Operational Programme (COMPETE 2020) under the PORTUGAL 2020 Partnership Agreement through the European Regional Development Fund (ERDF). Authors also thank the scientific collaboration of CBQF under the FCT project UID/Multi/50016/2013, and the financial support of QOPNA (FCT UID/QUI/00062/2013) and CICECO (FCT UID/CTM/50011/2013).

References

- [1] M Gatto, et al., Postharvest Biology and Technology, 2016, 120, 180-187.
- [2] F Tomás-Barberán, J.C Espín, J. Science of Food and Agriculture 2001, 81, 853-876.
- [3] H Qiang, L Yaguang, C Pei, Food Chemistry, 2008, 110, 847-851.
- [4] L Chen, et al., J. Agric. Food Chem, 2000, 48, 4997–5000.
- [5] M Kahkonen, et al., J. Agric. Food Chem, 1999, 47, 3954-3962.
- [6] R Pellegrini, et al., Free Radical Biology and Medicine, 1999, 26, 1231-1237.

Impact of addition of pomegranate peel extract and high-pressure on carrot juice preservation: quality, safety and sensorial aspects

João P. Trigo^{a,b,}, Elisabete M. C. Alexandre^{a,b}, Sara Silva^b, Ana Oliveira^b, Eduardo Costa^b, Jorge A. Saraiva^a, Manuela Pintado^b*

^aDepartamento de Química – Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

^bEscola Superior de Biotecnologia – Universidade Católica Portuguesa, Porto, Portugal

*joao-trigo@hotmail.com

Keywords: antioxidant activity, carrot juice, pomegranate peel extract, preservation, toxicity
Abstract

In this work, pomegranate peel was valorized through the incorporation of its extracts in carrot juice. High-pressure extraction was performed to obtain an aqueous pomegranate peel extract, screened for potential cytotoxicity effects. Later, this extract was added to raw carrot juice subsequently pasteurized by high pressure and conventional heat to compare the results. Throughout storage, several microbiological, physicochemical, enzymatic, and sensorial analyses were conducted.

Pomegranate peel extract did not show significant metabolic inhibition ($p < 0.05$). Fortified juices (2.5 mg/mL) showed lower counts ($p < 0.05$) than the non-fortified ones for total aerobic mesophiles and psychophiles. Total phenolics and hydrolysable tannins contents, as well as antioxidant activity (assessed by ABTS and ORAC methods), were always higher ($p < 0.05$) in supplemented juices (2.5 mg/mL) during the 28 days of storage. Generally, the extract addition did not affect ($p > 0.05$) any sensorial descriptor. On the 28th day of storage, HPP-treated samples exhibited lower counts in comparison to heat-treated samples ($p < 0.01$), but generally all samples showed identical contents in phenolic compounds and antioxidant activity ($p > 0.05$). Pressurized samples displayed higher ($p < 0.05$). Both preservation methods had similar sensory scores ($p > 0.05$) for odour, taste, persistency, and mouth-feel.

1. INTRODUCTION

The consumption of fruit has been increasing as recommended by the World Health Organization and Europe already produces around 74 million metric tons of fruit per year [1]. As a result, large amounts of wastes are generated and their disposal entails environmental problems requiring by-product management. These by-products can be valorized through the extraction of bioactive compounds, however conventional extraction methods, typically thermal-based, present several concerns mainly due to thermo-sensitive compound degradation. Non-thermal, green and emergent extraction technologies such as high-pressure extraction have been studied and its outputs are promising [2]. Therefore, the main goal of this research was to valorise the pomegranate peel, through incorporation of its extracts in carrot juice to enhance juice's quality and safety.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 High pressure-assisted extraction

The extractions of grounded and dried pomegranate peel were performed at 400 MPa for 30 min at room temperature. After pressurization, the extracts were centrifuged at 13 000 rpm for 10 min at 4 °C and the supernatant was filtered and collected.

2.2 Extract cytotoxicity assessment

Cytotoxicity was evaluated through XTT cell viability assay. Before this test, pomegranate peel extracts (PPE) were digested under simulative gastrointestinal conditions as described by Gião et al. [3].

2.3 Carrot juice processing

The juice was prepared in a high-speed juice extractor and fortified with 0, 1, and 2.5 mg/mL of PPE. For high-pressure treatment (HPP), juice aliquots were pressurized at 600 MPa for 10 min at room temperature, whereas for thermal treatment (TP), juice aliquots were heated in a water bath at 80 °C for 7 min.

2.4 Juice safety and quality assessments

Total aerobic mesophiles (TAM) and psychrophiles (TAP) were enumerated in plate count agar. These plates were incubated at 30 °C and 7 °C during 3 and 5 days, respectively.

Total phenolics (TPC) and hydrolysable tannins (HTC) contents were determined by the Oliveira et al. [4] and Willis et al. [5] methods, respectively. The radical cation ABTS^{•+} decolourization assay and the ORAC method were performed according to Re et al [6] and Dávalos et al. [7], respectively.

2.5 Sensorial analysis

The sensory descriptors used in this work were based on Picoucet et al. [8]. The trained panellists belonged to the ESB sensory evaluation panel.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The 5, 10, and 20 mg/mL of PPE digested under simulative gastrointestinal conditions showed a percentage metabolic inhibition of -14.3, -16.9, and -20.4%, respectively. Therefore, all concentrations tested displayed higher levels of cell viability in comparison to control ($p < 0.05$). On the 28th day of storage, pressurized samples exhibited lower microbial counts (TAM and TAP) when compared to heated samples ($p < 0.01$). Moreover, the supplementation (2.5 mg/mL) of treated juices led to a significant microbial count reduction for both type of microorganisms ($p < 0.05$). For instance, in TAM, a count decrease ($p < 0.05$) of about 9 and 11% was achieved for pressure and heat-treated juices, respectively. Similar percentage reductions were obtained for TAP. On day 42, all microbial counts were above or near the established maximum load ($6.00 \log_{10}$ CFU/mL).

Total phenolic content (Fig.1A) improvement was almost proportional to the PPE concentration and no significant variations were found between days 0 and 28 of storage as well as between HPP and TP ($p>0.05$). An identical trend was found in HTC (Fig.1B), however, a decline over storage was obtained ($p<0.05$). Additionally, on day 0, TP samples presented higher levels ($p<0.05$) of hydrolysable tannins than HPP and untreated (UT) samples, probably because thermal processing induced a breakdown of hydrolysable tannins with the release of less complex tannins. The ABTS values (Fig.1C) were similar between UT and treated samples ($p>0.05$). Nonetheless, throughout storage, antioxidant activity declined and only fortified juices with 2.5 mg PPE/mL had higher ($p<0.05$) ABTS values when compared to UT-0. Lastly, ORAC test (Fig.1D) had similar outputs to ABTS assay, although, on day 0, TP-treated juices exhibited higher values than HPP and UT juices, probably due to the HTC improvement observed for TP group.

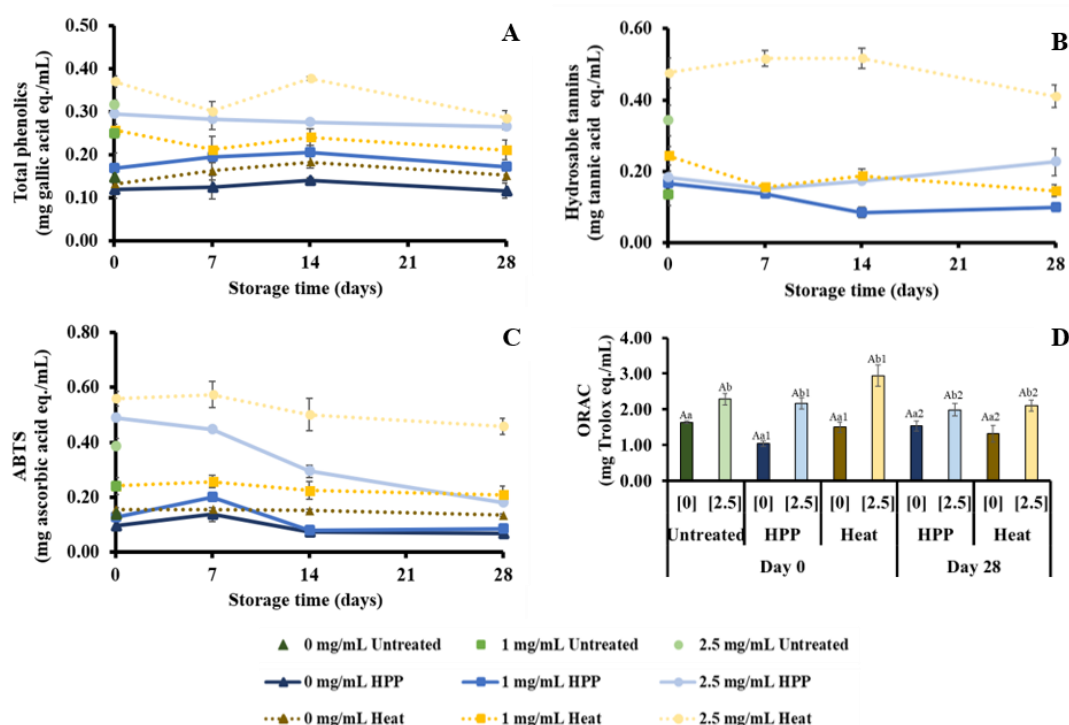


Figure 1. Evolution of (A) TPC, (B) HTC, (C) ABTS, and (D) ORAC values during 28 days of storage at 4 °C on untreated and treated (by HPP and TP) carrot juice without and with increasing doses of PPE.

All sensory descriptors (Table 1) were statistically similar between fortified and non-fortified juices ($p>0.05$). Furthermore, no major differences were detected between both pasteurization methods ($p>0.05$), apart from fresh/boiled carrot flavour and appearance descriptors, which displayed better scores in TP-treated juices ($p<0.05$). Despite HPP preserved better all instrumental colour parameters, TP possibly had a positive effect on anthocyanins and hydroxycinnamates, which translated into a higher orange colour intensity.

Table 1. Sensory scores for treated (by HPP and TP) carrot juice without and with PPE.

| | TP 0 mg/mL | TP 2.5 mg/mL | HPP 0 mg/mL | HPP 2.5 mg/mL |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Appearance | | | | |
| Orange colour (0) | 2.7 ± 0.5 ^{Aa} | 5.3 ± 0.5 ^{Aa} | 7.0 ± 0.8 ^{Ba} | 9.0 ± 0.8 ^{Ba} |
| Rust-brown colour (10) | | | | |
| Odour | | | | |
| Raw carrot (0) | 1.3 ± 0.5 ^{Aa} | 3.7 ± 1.7 ^{Aa} | 4.0 ± 2.2 ^{Aa} | 6.3 ± 1.2 ^{Aa} |
| Boiled carrot (10) | | | | |
| Taste and Flavour (0-10) | | | | |
| Sweet taste | 6.7 ± 0.9 ^{Aa} | 7.8 ± 1.0 ^{Aa} | 7.2 ± 1.2 ^{Aa} | 8.2 ± 1.9 ^{Aa} |
| Acid taste | 1.0 ± 0.0 ^{Aa} | 1.0 ± 0.0 ^{Aa} | 1.0 ± 0.0 ^{Aa} | 1.0 ± 0.0 ^{Aa} |
| Fresh carrot | 7.3 ± 0.9 ^{Aa} | 6.2 ± 0.6 ^{Aa} | 5.3 ± 1.2 ^{Ba} | 4.5 ± 1.1 ^{Ba} |
| Boiled carrot | 1.3 ± 0.5 ^{Aa} | 1.8 ± 0.2 ^{Aa} | 2.5 ± 0.7 ^{Ba} | 3.3 ± 0.5 ^{Ba} |
| Persistency | 6.0 ± 0.8 ^{Aa} | 6.0 ± 0.8 ^{Aa} | 6.0 ± 0.8 ^{Aa} | 6.0 ± 0.8 ^{Aa} |
| Mouth-feel (0-10) | | | | |
| Sliminess | 1.7 ± 0.5 ^{Aa} | 1.7 ± 0.5 ^{Aa} | 2.0 ± 0.0 ^{Aa} | 2.0 ± 0.0 ^{Aa} |
| Grittiness | 1.7 ± 0.9 ^{Aa} | 1.7 ± 0.9 ^{Aa} | 1.7 ± 0.9 ^{Aa} | 1.7 ± 0.9 ^{Aa} |

Within the same day different upper letters mean significant differences between treatments ($p < 0.05$); Within the same day different lower letters mean significant differences between PPE concentrations ($p < 0.05$); Different numbers mean significant differences between days ($p < 0.05$).

4. CONCLUSION

The incorporation of 2.5 mg/mL of PPE to HPP- and TP-treated carrot juices improve their microbial safety, as well as, its antioxidant activity over storage without jeopardizing the sensorial parameters.

Acknowledgements

This work was supported by National Funds from FCT-Fundação para a Ciência e a Tecnologia through project PEst-OE/EQB/LA0016/2013 and by FCT/MEC by the financial support to the QOPNA research Unit (FCT UID/QUI/00062/2013), through national funds and where applicable co-financed by the FEDER, within the PT2020 Partnership Agreement. Elisabete M. C. Alexandre is grateful for the financial support from FCT through the Post-doctoral SFRH/BPD/95795/2013.

References

- [1] Statista, Global fruit production in 2014, available in www.statista.com, 2016
- [2] EMC Alexandre, LG Castro, SA Moreira, M Pintado, JA Saraiva, Food Eng Rev, 2017, 9, 190-212
- [3] MS Gião, S Gomes, AR Madureira, A Faria, D Pestana, C Calhau, ME Pintado, I Azevedo, FX Malcata, Food Chem, 2012, 131, 761-767
- [4] A Oliveira, MH Gomes, EMC Alexandre, DPF Almeida, ME Pintado, J Agric Food Chem, 2014, 62, 12075-12081
- [5] RB Willis, Analyst, 1998, 123, 435-439
- [6] R Re, N Pellegrini, A Pannala, M Yang, C Rice-Evans, Free Radic Biol Med, 1999,

26,1231-1237

[7] A Dávalos, C Gómez-Cordovés, B Bartolomé, J Agric Food Chem, 2004, 52, 48-54

[8] PA Picoucet, C Sárraga, S Cofán, MD Guàrdia, LWT – Food Sci Technol, 2015, 62, 920-926

Use Of Digital Image Analysis For Monitoring The Ripening Of Pdo Serpa Cheese

João Dias^{1,4}, Nuno B. Alvarenga^{2,5}, Maria João Carvalho¹, Olga Amaral¹, A. Pedro Louro Martins^{2,5}, Cristina Pinheiro⁶, Ana Garrido⁶, Eliana Machado⁶, Patrícia Lage¹ and Maria F. Duarte^{3,6}

joao.dias@ipbeja.pt

¹ESA-Instituto Politécnico de Beja (IPBeja), Rua Pedro Soares, 7800-295 Beja, Portugal

²UTI-INIAV, Quinta do Marquês, Oeiras, Portugal

³CEBAL/IPBeja, Rua Pedro Soares, s.n, Ap 6158, 7801-908 Beja, Portugal

⁴GeoBioTec, Un. Nova de Lisboa, Campus da Caparica, 2829-516 Caparica, Portugal

⁵LEAF-ISA, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisbon, Portugal

⁶ICAAM, ECT, U. Evora, Ap. 94, 7006-554 Evora

1. INTRODUCTION

Serpa cheese is a Portuguese PDO cheese, with a semi-hard or hard consistency, light yellow color, few or no holes and intense flavour. It is obtained by slowly draining the curd, after coagulation of raw ewe's milk, with a vegetable coagulant infusion of *Cynara cardunculus* L. The aim of this work was to analyze the evolution of the color in the interior of Serpa cheese and the area of gas holes during the ripening process, using different coagulants.



Figure 1 - Pressing



Figure 2 – Serpa cheese at 0d

2. MATERIAL AND METHODS

The experimental design included three flower extracts from different *C. cardunculus* (C1, C2 and C3), and one commercial animal coagulant (AC). For each coagulant, groups of four cheeses were picked after 0, 14 and 35d of ripening dates. Samples were analyzed considering color (CIE L* a* b* and RGB), digital image (Fig. 1) and structural parameters (viscoelastic measurement and texture analysis) in the interior of cheese, together with chemical parameters (moisture, pH, acidity).

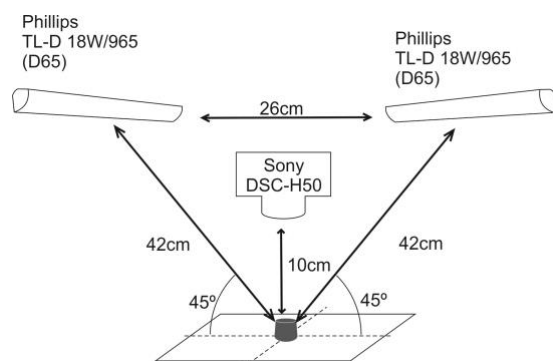


Figure 3 – Image analysis set up



Figure 4 – Sample image of image analysis of cheese slices

3. RESULTS

The results evidenced an increase of the area occupied by the holes until 14d, followed by a decrease until the end of ripening time. Pearson correlation coefficients between structural indicators, image parameters (ratio of gas holes) and chemical parameters were calculated. The obtained results indicate considerable physical changes during ripening, reflecting the biochemical reactions which occur inside Serpa cheese and how these changes affect the area occupied by the gas during the fermentation.

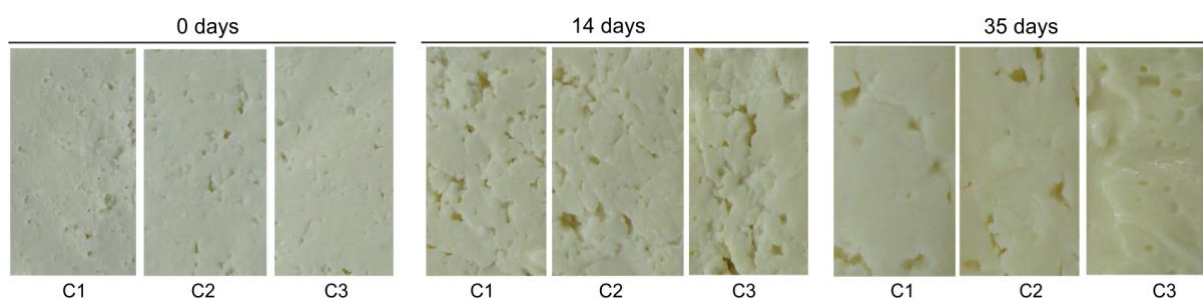


Figure 5: Evolution of Serpa cheese during ripening

Acknowledgements: The present work was supported by ValBioTecCynara (ALT20-03-0145-FEDER-000038) – Economic valorization of Cardoon (*Cynara cardunculus*): study of natural variability and biotechnological applications), cofinanced by FEDER under the Alentejo 2020 Program. FCT for UID/AGR/00115/2013 to ICAAM, for UID/AGR/04129/2013 to LEAF and for UID/GEO/04035/2013 to GEOBIOTEC.

Effect of shoot maturity and different withering duration on the catechins and xanthines contents of tea from Azorean *Camellia sinensis*

Lisete Paiva^{a,b,}, Elisabete Lima^{b,c}, Madalena Motta^a, José Baptista^{b,c}*

^aPlantações de Chá Gorreana, Gorreana, Maia, S. Miguel, Azores, Portugal

^bBiotechnology Centre of Azores (CBA), University of Azores, Ponta Delgada, S. Miguel, Azores, Portugal

^cInstitute of Agricultural and Environmental Research and Technology (IITAA), University of Azores, Ponta Delgada, S. Miguel, Azores, Portugal

*lisete.s.paiva@uac.pt

Keywords: human health; *Camellia sinensis*; catechins; xanthines; HPLC/DAD

ABSTRACT

The objective of this study was to explore the effects of shoot maturity and withering duration time on the *Camellia sinensis* tea composition, in order to find the best processing conditions to produce tea with maximum impact on the human health. The determination of the major phenolic antioxidants flavan-3-ols (catechins) and purine alkaloids (xanthines) was made using high performance liquid chromatography (HPLC). The samples, composed by bud, 1st, 2nd and 3rd leaves plus internodes, dried at 40 °C, in order to preserve the biochemical composition, presented the following results in percentage of the total green tea polyphenols (GTP). Concerning the effect of shoot maturity, the young leaves showed higher average values for (-)-epigallocatechin-gallate (EGCG, 25.38%) and caffeine (CAF, 43.04%) as compared to 22.42% and 39.29% for old leaves, respectively. Oppositely, young leaves presented lower average values of (-)-epicatechin (EC, 2.84%) and (-)-epicatechin-gallate (ECG, 18.94%) as compared to 4.07% and 25.76% for old leaves, respectively. Relatively to the withering effect, the usual duration (12 hours), used for *C. sinensis* processing, revealed higher values for EGCG (29.18%) and ECG (34.40%), as compared to long withering duration (48 hours) that presented the lower average values of 12.77% and 17.50%, respectively. However, higher average values were found in CAF for long withering as compared to the usual withering process (55.16% and 22.06%, respectively). The EC values were not affected by the withering time showing similar results for long and usual duration (4.19% and 4.77%, respectively). In conclusion, the results clearly show differences in the catechins and caffeine contents, accordingly to the effects of shoot maturity and different withering duration, and consequently, differences in the tea human health benefits.

1. INTRODUCTION

Various kinds of tea consumed in the world were produced from the same plant species, *Camellia sinensis* L. that were originated from China. Tea is probably one of the most common beverages all over the world and its popularity is attributed to its sensory properties, unique aroma, characteristic flavor and health benefits [1,2]. Since the last decade of 19th century, tea

is also produced in one unique place in Europe: São Miguel, Azores Archipelago (Portugal) [3]. The Azorean green tea is processed between April and September and the amount of polyphenols are generally 1.4-fold higher in Summer than in Spring, presumably because of the higher growth rate and metabolic activities of the young leaves during that season. Therefore, it is important to use young leaves and follow the plucking standards to achieve optimum tea quality. The composition of tea depends on many factors, such as: season, species, age of the leaf, climate and type of soil. Apart from preharvest agronomic practices, there are two main factors affecting tea quality: plucking period and processing [3]. About 30% of dry weight (DW) of tea leaves are comprised of polyphenols that exist principally as flavonols (mostly catechins), flavonols usually as *o*-glycosides and phenolic acids that are the major soluble components in tea liquor. The green tea polyphenols (GTP) are the compounds responsible for most of the tea health benefits [4]. The withering step involves both chemical and physical changes through which green tea leaves are prepared for maceration [5]. Green tea leaves contain about 70–85% moisture and during withering this value is reduced to about 60–66% for maceration with the orthodox method. The objective of this study was to search for the effects of shoot maturity and withering duration on the *C. sinensis* tea composition in order to find the best processing conditions to produce tea with maximum impact on the human health.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

Acetonitrile, methanol, ethyl acetate, catechins (EGCG, EC, ECG and GCG) and caffeine were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Orthophosphoric acid was obtained from E. Merck (Darmstadt, Germany) and chloroform was purchased from Riedel-de Haen (Seelze-Aktiengesellschaft, Germany).

2.2. Extraction and preparation of polyphenols fractions from green tea samples

Samples of different parts of Azorean *C. sinensis* were provided by Gorreana Tea Plantation (Azores). The protocol for the extraction of total green tea polyphenols (GTP) and caffeine was a slightly modified methodology described by Baptista et al. [6]. The samples (0.1 g of the dried ground *C. sinensis*) were steeped at 70 °C for 15 min in 20 mL of distilled water, under nitrogen to prevent oxidation by the atmospheric oxygen, using a thermal flask. This extraction step was repeated three more times and the combined aqueous extracts, after cooling for 10 min, was filtered under vacuum through a 0.45 µm (pore size) cellulose acetate membrane to remove particulate matter, concentrated in a rotaevaporator at 40 °C, freeze-dried and then the green tea powder was stored under refrigerated conditions for further assays. A sample of 100 mg from the freeze-dried residue was dissolved in 25 mL (volumetric flask) of distilled water and an aliquot of 10 mL was used for the next extraction process by solvent-solvent partition. The methylxanthines (caffeine, theobromine and theophylline) and pigments were extracted with the same volume of chloroform and the organic phase was rejected. Then, 10 mL of ethyl

acetate was added to the same volume of aqueous solution for the polyphenols extraction. This step was repeated three more times and the extract solutions were combined. The ethyl acetate layer after separation was evaporated in a vacuum rotaevaporator and the residue (crude catechins) was dissolved in 500 μL of distilled water and then 10 μL sample was injected into HPLC.

2.3. Determination of catechins by RP-HPLC

For the methodology of catechins separation and quantification, the reversed phase column Ultropac Spherisorb ODS 2-3 μm column (4.6 mm x 10 cm) from LKB (Bromma, Sweden) was used following the eluent system: phase (A) acetonitrile:ethyl acetate:0.1% orthophosphoric acid (8.5:2:89.5, v/v/v) : water (1:1, v/v) and phase (B) acetonitrile:water (1:1, v/v) followed by a linear gradient ($t_0 = 100\%$ A, $t_{10} = 100\%$ A, $t_{20} = 80\%$ A) and held at this composition until the end of the run at a flow rate of 0.8 mL/min. The column was maintained at 35 °C, attached to the Agilent HPLC system model 1200 equipped with a diode array detector (DAD) at 280 nm.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the percentage of the major green tea polyphenols (GTP) and caffeine under the effects of shoot maturity and withering duration of the *C. sinensis* components. Concerning the effect of shoot maturity, the young leaves presented higher average values for EGCG (25.38%) and CAF (43.04%) as compared to 22.42% and 39.29% for old leaves, respectively. Oppositely, young leaves showed lower average values of EC (2.84%) and ECG (18.94%) as compared to 4.07% and 25.76% for old leaves, respectively. Relatively to the withering effect, the usual duration (12–18 hours), used for *C. sinensis* processing, revealed higher values for EGCG (29.18%) and ECG (34.40%), as compared to long withering duration (48 hours) that presented the lower average values of 12.77% and 17.50%, respectively. However, higher average values were found in CAF for long withering (55.16%) as compared to the usual withering process (22.06%). The EC values were slightly affected by the withering duration showing similar results of 4.19% and 4.77% for long and usual duration, respectively. Oppositely, according to Hülya and Aysun [7], it is possible to store fresh tea leaves at controlled temperature and relative humidity conditions to preserve them until the time of processing. This can give the opportunity to small capacity tea plants to store their raw tea leaves for about 1 month.

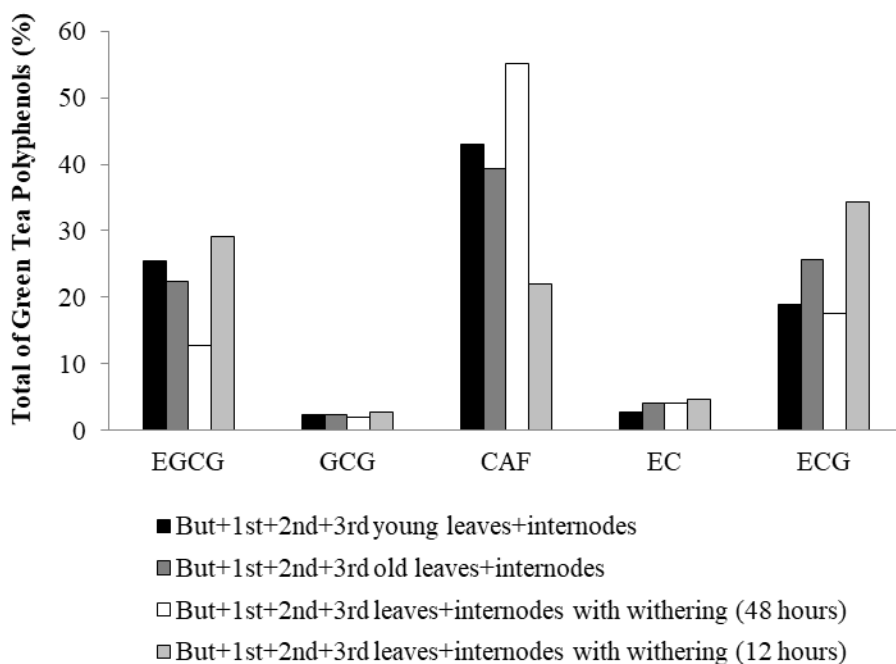


Figure 1. Percentage of total green tea polyphenols (GTP) and the effects of shoot maturity and withering duration on the *Camellia sinensis* tea composition. Legend: EC = (-)-epicatechin, ECG = (-)-epicatechin-gallate, EGCG = (-)-epigallocatechin-gallate, GCG = gallocatechin-gallate and CAF = caffeine.

4. CONCLUSION

The RP-HPLC is an excellent technique for the determination of the different catechins and caffeine contents in different parts of *C. sinensis*. The composition of tea leaves varies considerably with increasing maturity. The total polyphenolic content decreased significantly with increasing leaf maturity, particularly EGCG and CAF. The traditional withering (*ca* 12-18 hours) have significant effect on the tea quality [8] and presented higher values of EGCG, GCG, EC and ECG as compared with long-time withering (48 or more hours), except for the CAF content which presents lower value.

References

- [1] CS Yang, J Hong, Ann Rev Nutr, 2013, 33, 161–181.
- [2] P Namita, R Mukesh, KJ Vijay, Global J Pharmacol, 2012, 6, 52–59.
- [3] J Baptista, JFP Tavares, RCB Carvalho, J Food Compos Anal, 1999, 12, 273–287.
- [4] HN Graham, Prev Med, 1992, 21, 334–350.
- [5] KI Tomlins, A Mashigaidze, Food Chem, 1997, 4, 573–580.
- [6] J Baptista, E Lima, L Paiva, AR Castro, Food Sci Technol, 2014, 59, 1152–1158.
- [7] O Hülya, Y Aysun, J Food Process Pres, 2010, 34, 653–665.
- [8] M Obanda, PO Owuor, R Mang'oka, MM Kavoi, Food Chem, 2004, 85, 163–173.

Variability of catechins and xanthines contents on tea from different parts of Azorean *Camellia sinensis*

Lisete Paiva^{a,b}, Elisabete Lima^{b,c}, José Baptista^{b,c,*}

^aPlantações de Chá Gorreana, Gorreana, Maia, S. Miguel, Azores, Portugal

^bBiotechnology Centre of Azores (CBA), University of Azores, Ponta Delgada, S. Miguel, Azores, Portugal

^cInstitute of Agricultural and Environmental Research and Technology (IITAA), University of Azores, Ponta Delgada, S. Miguel, Azores, Portugal

*jose.ab.baptista@uac.pt

Keywords: human health; *Camellia sinensis*; catechins; xanthines; HPLC/DAD

ABSTRACT

The objective of the present study was to investigate the variability of catechins (flavan-3-ols) and xanthines (purine alkaloids) contents in different parts of the Azorean *Camellia sinensis*, to find the best parts combination in order to make a tea blend with maximum impact on the human health. The determination of the major catechins and xanthines was made using high performance liquid chromatography (HPLC) and the results were expressed in percentage of the total green tea polyphenols (GTP). Flowers presented the highest level of (-)-epigallocatechin-gallate (EGCG) with a value of 41.23% and the internodes presented the lowest value (6.31%). The internodes presented the highest value of caffeine (CAF, 61.50%) followed by the combination of bud, 1st and 2nd leaves (57.61%) and the flowers the lowest value (12.83%). The 2nd leaf presented the maximum values of (-)-epicatechin (EC) and galocatechin-gallate (GCG) with 4.58% and 2.38%, respectively, and the bud presented the lowest values of 1.06% and 0.37%, respectively. The flowers also presented the maximum value of (-)-epicatechin-gallate (ECG, 34.88%) and the internodes the minimum value (13.23%). In conclusion, the results clearly show differences in the catechins and caffeine contents in different parts of the Azorean *C. sinensis*, and consequently, differences in the tea human health benefits.

1. INTRODUCTION

Tea, known as the most widely consumed beverage in the world after water, especially enjoyed by the Chinese, Japanese and Korean populations, stirs great interests in the scientific community for its wide beneficial effects to humans' health [1]. Drinking green tea may reduce the risk of many diseases, such as cardiovascular diseases and cancers, as teas have a variety of biological activities including anti-tumor, antioxidant, and anti-obesity [2, 3]. Previous studies have demonstrated that amino acids, polyphenols and purine alkaloids are important nutritional and active components in green tea. Polyphenols, the major antioxidant constituents of tea from *Camellia sinensis*, are considered responsible not only for their flavor characteristics, but also for their wide variety of health benefits [4-6]. The major flavonoids of green tea are various

catechins, which are found in greater amounts in green tea than in black tea [7]. The mainly catechins found in green tea are: (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), (-)-gallocatechin-3-gallate (GCG) and (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG). The tea preparation methods influence quantitatively and qualitatively the catechins profile, and their concentrations in the tea liquor, that differ also due to differences in variety, origin, and growing conditions [8]. In order to find the best combination of *C. sinensis* parts to make a tea blend with maximum impact on the human health, the objective of the present study was to investigate the variability of catechins and xanthines contents in different parts of the Azorean tea plant. To perform this objective the high-performance liquid chromatography/diode array detection (HPLC/DAD) was used for the simultaneous determination of major tea catechins (EC, EGCG, GCG and ECG) and alkaloids, namely caffeine (CAF), following the methodology of Baptista et al. [9].

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

Acetonitrile, methanol, ethyl acetate, catechins (catechin, C; epicatechin, EC; epigallocatechin, EGC; epicatechin-3-gallate, ECG; epigallocatechin-3-gallate, EGCG; gallocatechin-3-gallate, GCG and gallocatechin, GC) and caffeine (CAF) were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Orthophosphoric acid was obtained from E. Merck (Darmstadt, Germany) and chloroform was purchased from Riedel-de Haen (Seelze-Aktiengesellschaft, Germany).

2.2. Extraction and preparation of polyphenols fractions from green tea samples

Samples of different parts of Azorean *C. sinensis* were provided by Gorreana Tea Plantation (Azores). The protocol for the extraction of total green tea polyphenols (GTP) and caffeine from the samples was a slightly modified methodology described by Baptista et al. [9]. The samples (0.1 g of the dried ground *C. sinensis* components) were steeped at 70 °C for 15 min in 20 mL of distilled water, under nitrogen to prevent oxidation by the atmospheric oxygen, using a thermal flask. This extraction step was repeated three more times and the combined aqueous extracts, after cooling for 10 min, was filtered under vacuum through a 0.45 µm (pore size) cellulose acetate membrane to remove particulate matter, concentrated in a rotaevaporator at 40 °C, freeze-dried and then the green tea powder was stored under refrigerated conditions for further assays. A sample of 100 mg from the freeze-dried residue was dissolved in 25 mL (volumetric flask) of distilled water and an aliquot of 10 mL was used for the next extraction process by solvent-solvent partition. The methylxanthines (caffeine, theobromine and theophylline) and pigments were extracted with the same volume of chloroform and the organic phase was rejected. Then, 10 mL of ethyl acetate was added to the same volume of aqueous solution for the polyphenols extraction. This step was repeated three more times and the extract solutions were combined. The ethyl acetate layer after separation was evaporated in a vacuum rotaevaporator and the residue (crude catechins) was dissolved in 500 µL of distilled water and then 10 µL sample was injected into HPLC.

2.3. Determination of catechins by RP-HPLC

For the methodology of catechins separation and quantification, the reversed phase column Ultropac Spherisorb ODS 2-3 μm column (4.6 mm x 10 cm) from LKB (Bromma, Sweden) was used following the eluent system: phase (A) acetonitrile:ethyl acetate:0.1% orthophosphoric acid (8.5:2:89.5, v/v/v) : water (1:1, v/v) and phase (B) acetonitrile:water (1:1, v/v) followed by a linear gradient ($t_0 = 100\%$ A, $t_{10} = 100\%$ A, $t_{20} = 80\%$ A) and held at this composition until the end of the run at a flow rate of 0.8 mL/min. The column was maintained at 35 °C, attached to the Agilent HPLC system model 1200 equipped with a diode array detection (DAD) at 280 nm.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The Table 1 shows the variability of catechins and xanthines contents on tea from different parts of Azorean *C. sinensis* in percentage of the total green tea polyphenols (GTP). Flowers presented the highest level of EGCG with a value of 41.23% and the internodes presented the lowest value (6.31%). The flowers also presented the maximum value of ECG (34.88%) and the internodes the minimum value (13.23%). The internodes presented the highest value of CAF (61.50%) followed by the combination of bud, 1st and 2nd leaves (57.61%) and the flowers the lowest value (12.83%). The bud presented the highest value of GC (19.43%) followed by internodes (11.85%) and 1st leaf (10.63%). The 2nd leaf presented the maximum values of EC and GCG with 4.58% and 2.38%, respectively, and the bud presented the lowest values of 1.06% and 0.37%, respectively. The catechins that presented lower values in all different parts of *C. sinensis* are C and EGC that varies between 0.13 to 0.71% and 0.18 to 0.91%, respectively.

Table 1. Catechins and xanthines contents on tea from different parts of Azorean *Camellia sinensis* in percentage of total green tea polyphenols ^a.

| <i>C. sinensis</i> samples | C | EC | EGC | EGCG | ECG | GC | GCG | CAF |
|---|-----------|-----------|-----------|------------|------------|-------------|-----------|------------|
| Flowers | 0.58±0.06 | 3.73±0.08 | 0.18±0.02 | 41.23±1.66 | 34.88±1.22 | 1.99±0.05 | 1.86±0.13 | 12.83±0.21 |
| Bud | 0.13±0.02 | 1.06±0.03 | 0.63±0.08 | 13.98±0.15 | 19.62±1.04 | 19.43±0.311 | 0.37±0.04 | 43.20±1.23 |
| 1 st Leaf | 0.21±0.03 | 2.32±0.10 | 0.91±0.08 | 11.37±0.11 | 23.31±1.12 | 10.63±0.20 | 1.30±0.09 | 48.36±1.33 |
| 2 nd Leaf | 0.50±0.02 | 4.58±0.12 | 0.83±0.07 | 18.85±0.23 | 33.45±1.21 | 3.22±0.09 | 2.38±0.11 | 35.04±1.11 |
| Internodes | 0.24±0.02 | 4.41±0.15 | 0.46±0.05 | 6.31±0.08 | 13.23±0.34 | 11.85±0.17 | 1.49±0.13 | 61.50±2.32 |
| Bud+1 st +2 nd Leaves | 0.45±0.05 | 2.72±0.08 | 0.77±0.06 | 8.93±0.14 | 24.90±1.32 | 2.08±0.06 | 1.06±0.09 | 57.61±1.93 |
| Bud+1 st +2 nd Leaves+Internodes | 0.33±0.02 | 4.06±0.14 | 0.32±0.04 | 11.28±0.16 | 23.26±1.17 | 7.34±0.15 | 1.28±0.08 | 49.54±1.74 |
| Bud+1 st +2 nd +3 rd Leaves+Internodes | 0.71±0.05 | 4.28±0.14 | 0.35±0.05 | 13.06±0.15 | 17.89±1.06 | 3.87±0.05 | 2.03±0.11 | 56.41±1.89 |

^a Values are mean \pm SD ($n = 3$). Legend: C = (+)-catechin, EC = (+)-epicatechin, EGC = (-)-epigallocatechin, EGCG = (-)-epigallocatechin-3-gallate, ECG = (-)-epicatechin-3-gallate, GC = (-)-gallocatechin, GCG = (-)-gallocatechin-3-gallate and CAF = caffeine.

Chen et al. [10] also studied the bud, 1st and 2nd leaves, but our results presented higher values of EC and ECG in comparison to the referred study, that presented values of 0.06%, 1.3% and 1.6% for bud, 1st and 2nd leaves and 5.2%, 5.7% and 4.9% for the same parts, respectively. However, Chen et al. [10] presented higher value for EGC in bud (2.3%) and in the 1st leaf

(4.1%). Higher values were also observed for EGCG in 2nd leaf (21.0%) and in bud (29.4%). In terms of CAF the results were similar between the two studies.

4. CONCLUSION

In conclusion, the results clearly show differences in the catechins and xanthines contents in different parts of the Azorean *C. sinensis*. The combination of the flowers, internodes plus the 1st and 2nd leaves presented the highest concentration in EGCG, ECG, EC, GCG and CAF or, alternatively, the combination of same material with reduced internode part will be a good mixture for people very sensitive to caffeine. It is also important to be noted that the composition of the Azorean tea catechins also reflect the influence of geographic origin of the tea samples, climate, season, variety, type of soil (volcanic) and the horticultural and processing techniques [9]. Furthermore, these influences can explain the differences observed relatively to others studies. However, other research are needed to better explain the variability observed in different parts of Azorean *C. sinensis*.

References

- [1] J Baptista, E Lima, L Paiva, AL Andrade, MG Alves, Food Chem, 2012, 132, 2181–2187.
- [2] S Gupta, K Hastak, N Ahmad, JS Lewin, H Mukhtar, Proc Natl Acad Sci, 2001, 98, 10350–10355.
- [3] RR He, L Chen, BH Lin, Y Matsui, XS Yao, H Kurihara, Chin J Integr Med, 2009, 15, 34–41.
- [4] DC Chu, LR Juneja, General chemical composition of green tea and its infusion, In: T Yamamoto, LR Juneja, DC Chu, M Kim, Eds., Chemistry and Applications of Green Tea, 1997, CRC Press: Boca Raton, USA.
- [5] DA Camfield, C Stough, J Farrimond, AB Scholey, Nutr Rev, 2014, 72, 507–522.
- [6] J Jankun, SH Selman, R Swiercz, Nature, 1997, 387, 561.
- [7] JA Vinson, Biofactors, 2000, 13, 127-132.
- [8] S Khokhar, SGM Magnusdottir, J Agric Food Chem, 2002, 50, 565-570.
- [9] J Baptista, E Lima, L Paiva, AR Castro, Food Sci Technol, 2014, 59, 1152–1158.
- [10] C-N Chen, C-M Liang, J-R Lai, Y-J Tsai, J-S Tsay, J-K Lin, J Agric Food Chem, 2003, 51, 7495–7503.

Maximização da extração de antocianinas de *Hibiscus sabdariffa* por diferentes métodos para obtenção de corantes alimentares

José Pinela^{1a}, M.A. Prieto^{a,b}, Eliana Pereira^a, Bernardo Lopes^a, Inès Jabeur^a, Maria Filomena Barreiro^{a,c}, Lillian Barros^a, Isabel C.F.R. Ferreira^{a,*}

^a Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal

^b Nutrition and Bromatology Group, Faculty of Food Science and Technology, University of Vigo, Ourense, Spain

^c Laboratório de Processos de Separação e Reação - Laboratório de Catálise e Materiais (LSRE-LCM), Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal

* iferreira@ipb.pt

Palavras chave: *Hibiscus sabdariffa* L.; antocianinas; corantes naturais; métodos de extração; metodologia de superfície de resposta

RESUMO

Este estudo teve como objetivo maximizar a extração de antocianinas a partir de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. utilizando métodos assistidos por calor (EAC) e ultrassom (EAU), para obtenção de um corante natural na gama do vermelho. As variáveis inerentes a cada processo (i.e. tempo, percentagem de etanol e temperatura ou potência) foram combinadas em desenhos fatoriais de 5 níveis e posteriormente analisadas pela metodologia de superfície de resposta (MSR). O teor de antocianinas foi usado como variável dependente. Os modelos teóricos desenvolvidos foram validados estatisticamente e usados na determinação das condições que maximizam a extração destes pigmentos. O método EAU foi o mais eficiente, tendo originado teores de antocianinas superiores a 50 mg/g de extrato. Os efeitos dose-resposta da razão sólido/líquido foram seguidamente determinados nas condições otimizadas para as 3 variáveis, tendo-se verificado uma melhoria na capacidade de extração com o aumento deste fator. Os resultados sustentam o uso de *H. sabdariffa* como uma fonte sustentável de corantes naturais.

1. INTRODUÇÃO

A consciencialização do consumidor atual sobre a existência de alternativas naturais aos aditivos artificiais, hoje em dia massivamente utilizados na indústria alimentar, mas com potenciais efeitos tóxicos e alergénicos, tem promovido a procura por alimentos formulados com ingredientes de base natural [1,2]. A investigação nesta área tem ganho destaque [3,4], mas ainda é necessário alargar o leque de opções disponíveis, encontrar novas fontes com potencial real e desenvolver processos de extração e estabilização eficientes e sustentáveis. O mercado dos corantes alimentares tem crescido rapidamente, pois a cor, além de ser um importante atributo sensorial dos alimentos, também influencia o seu sucesso comercial [5]. Paralelamente, há um interesse crescente em substituir os corantes obtidos artificialmente por homólogos naturais, uma vez que os primeiros têm sido associados a efeitos adversos para a saúde do consumidor [6]. No entanto, a elevada estabilidade e o baixo custo dos corantes sintéticos têm limitado o uso das alternativas naturais pelo setor industrial [1].

Com o objetivo de tornar os corantes naturais numa alternativa real e eficiente face aos análogos artificiais, é necessário encontrar fontes promissoras e desenvolver processos de extração sustentáveis. A espécie *Hibiscus sabdariffa* L. surge como uma forte candidata, pois os seus cálices vermelhos são ricos em antocianinas, maioritariamente delfinidina-3-sambubiósido e cianidina-3-sambubiósido [7–9]. Além disso, estes apresentam uma forte atividade antioxidante e anti-hipertensiva e efeitos anti-hipercolesterolémicos [10,11]. A extração destes compostos de elevado valor acrescentado pode ser intensificada por várias técnicas, tais como a sonicação [12]. No entanto, uma vez que a eficiência destes processos é afetada por uma série de variáveis, torna-se necessário adotar desenhos experimentais apropriados e ferramentas de otimização para determinar condições ótimas de processamento. Este estudo teve com objetivo otimizar a recuperação de antocianinas de cálices vermelhos de *H. sabdariffa*, utilizando métodos de extração assistida por calor e ultrassom, para posterior utilização como corantes naturais. As variáveis mais relevantes de cada processo foram combinadas num desenho composto central circunscrito e otimizadas por MSR.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e métodos de extração

Os cálices vermelhos de *H. sabdariffa* foram reduzidos a pó e processados de acordo com o desenho experimental apresentado na **Tabela 1**. A *extração assistida por calor* (EAC) foi realizada num matraz em banho termostatzado sob agitação contínua, considerando as variáveis: tempo (t , 55-150 min), temperatura (T , 20-90 °C) e proporção de etanol (S , 0-100%). A *extração assistida por ultrassom* (EAU) foi feita recorrendo a uma sonda ultrassónica de 20 kHz, considerando as variáveis: tempo (t , 3-36,5 min), potência (P , 100–500 W) e proporção de etanol (S , 0–100%). A relação sólido/líquido (S/L) foi mantida a 30 g/L. Após extração, a mistura foi centrifugada (6000 rpm, 10 min) e filtrada.

Tabela 1. Desenhos experimentais usados nas extrações EAC e EAU de antocianinas.

| VALORES CODIFICADOS | VALORES NATURAIS | | | | | |
|------------------------|------------------|----------|---------|-----------|---------|---------|
| | EAC | | | EAU | | |
| | t (min) | T (°C) | S (%) | t (min) | P (W) | S (%) |
| -1.68 | 30 | 30 | 0 | 3 | 100 | 0 |
| -1 | 54.3 | 42.2 | 20.3 | 11.5 | 180 | 20.3 |
| 0 | 90 | 60 | 50 | 24 | 300 | 50 |
| +1 | 125.7 | 77.9 | 79.8 | 36.5 | 420 | 79.8 |
| +1.68 | 150 | 90 | 100 | 45 | 500 | 100 |

2.2 Análise de antocianinas

As antocianinas foram analisadas num sistema Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific) equipado com um detetor de díodos e um espectrómetro de massa (LTQ XL linear ion trap, Thermo Finnigan) com ionização por *electrospray* (LC-DAD-ESI/MSⁿ), conforme descrito por Jabeur *et al.* [13]. Os resultados foram expressos em mg/g extrato.

2.3 Desenho experimental e processo de otimização

Foi aplicado um desenho composto central circunscrito (DCCC) de 5 níveis com 3 variáveis independentes (**Tabela 1**) para a otimização dos processos EAC e EAU. O DCCC incluiu 14 combinações independentes e 6 repetições no centro do desenho. O teor de antocianinas (soma

de delfinidina-3-*O*-sambubiósido e cianidina-3-*O*-sambubiósido) foi a variável de resposta utilizada na otimização por MSR. Os modelos teóricos foram ajustados por meio do cálculo de mínimos quadrados usando uma equação polinomial de segunda ordem [14]. As respostas produzidas pelos modelos teóricos foram maximizadas utilizando o método *Simplex* [15].

2.4 Análise dose-resposta da razão sólido/líquido

Após otimizar as condições experimentais para as variáveis t , T e S , a razão S/L (g/L) foi incluída como a quarta variável a ser otimizada, cujos efeitos foram representados usando a equação $Y = b + m \cdot S/L$, onde Y é o critério de resposta e b e m correspondem à interseção e ao declive, respetivamente [14]. O parâmetro m está relacionado com a eficiência de extração em função do aumento da razão S/L (valores positivos indicam uma melhoria na extração).

2.5 Montagem dos modelos e análise estatística

A análise dos dados experimentais e a adequação dos modelos basearam-se na determinação de coeficientes e sua significância, e na avaliação da consistência dos modelos e de outros critérios de avaliação estatística, conforme descrito por Pinela *et al.* [14].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os modelos teóricos desenvolvidos foram ajustados com sucesso aos dados experimentais, validados estatisticamente ($R^2 = 0.96$ e 0.97 para EAC e EAU, respetivamente) e usados na determinação das condições que maximizam a extração de antocianinas a partir dos cálices de *H. sabdariffa*, pois a variabilidade da resposta poder ser explicada pelas variáveis t , T e S .

Os maiores rendimentos de extração foram obtidos pelo método EAU, o qual terá promovido a rutura do material vegetal através de forças de cavitação e a entrada de solvente nos tecidos com consequente libertação de solutos, intensificando assim a transferência de massa. Este método originou $51,76 \pm 3,70$ mg antocianinas/g extrato quando aplicado: $t = 26,1$ min, $P = 296,6$ W e $S = 39,1\%$ etanol, v/v; enquanto o método EAC originou $20,86 \pm 1,24$ mg antocianinas/g extrato quando: $t = 30,0$ min, $T = 30,0$ °C e $S = 0,0\%$ de etanol (v/v). Ambos os métodos otimizados apresentaram algumas semelhanças em termos de T (~30 °C) e t (26-30 min), indicando que os valores mais baixos obtidos por EAC não terão sido causados por degradação térmica dos compostos. Em contraste, a resposta ótima da EAU foi alcançada com a aplicação de ultrassom e uma maior proporção de etanol (traduzindo um maior custo em termos de energia e solvente), enquanto a água foi um solvente adequado para a EAC. No entanto, os valores máximos alcançados por cada método foram muito diferentes e, por isso, devem ser tidos em conta ao selecionar o mais adequado para a recuperação destes pigmentos. Quanto aos efeitos da variável S/L , avaliados nas condições ótimas de t , T e S previamente estabelecidas para cada método de extração, foi verificada uma melhoria na capacidade de extração com o aumento desta quarta variável (testada entre os 5 e os 200 g/L), pois os valores de m foram positivos para ambos os métodos (0.023 para EAC e 0.033 para EAU; $R^2 > 0.94$).

Este é um resultado promissor pois, à escala industrial, são desejadas razões S/L elevadas para assim maximizar o rendimento de extração com um consumo mínimo de solvente.

Em conclusão, os dados experimentais foram ajustados com sucesso aos modelos teóricos utilizados para determinar as condições ótimas de extração. A EAU foi o método mais eficiente, pois permitiu recuperar $23,83 \pm 2,44$ mg de antocianinas por g de planta seca e obter $51,76 \pm 3,70$ mg destes pigmentos por cada g de extrato. Para a variável S/L , cujos efeitos foram avaliados nas condições ótimas inicialmente determinadas para as variáveis t , T e S , os valores positivos de m evidenciaram que o aumento desta razão melhora a eficiência de extração. Além disso, a quantidade de antocianinas obtidas por EAU foi quase três vezes superior à obtida por EAC. De acordo com estes resultados, é possível afirmar que os cálices de *H. sabdariffa* podem ser usados como uma fonte viável de antocianinas para a produção de corantes de base natural, sendo uma das matrizes mais ricas em antocianinas descritas na literatura. Além disso, este estudo suporta o *scale-up* do processo de extração que permite obter corantes na gama do vermelho com aplicações nos setores alimentar, farmacêutico e cosmético, entre outros.

Agradecimentos

FCT (Portugal) e FEDER no âmbito do Programa PT2020 pelo apoio financeiro ao CIMO (UID/AGR/00690/2013) e ao LA LSRE-LCM (POCI-01-0145-FEDER-006984) e pelos contratos de investigação de J. Pinela (Projeto AllNatt, POCI-01-0145-FEDER-030463) e L. Barros; ao FEDER através do Programa Operacional Regional Norte 2020, no âmbito do Projeto NORTE-01-0145-FEDER-023289: DeCodE e Projeto Mobilizador Norte-01-0247-FEDER-024479: ValorNatural@; ao FEDER-Interreg Espanha-Portugal pelo apoio financeiro através do projeto 0377_Iberphenol_6_E. À Xunta de Galicia pelo apoio a M.A. Prieto.

Referências

- [1] M Caroch, P Morales, I C F R Ferreira, Trends Food Sci Technol, 2015, 45, 284-295.
- [2] N Martins, C L Roriz, P Morales, et al., Trends Food Sci Technol, 2016, 52, 1-15.
- [3] H H S Almeida, L Barros, J C M Barreira, et al., Food Chem, 2018, 261, 224-232.
- [4] M Caroch, L Barros, J C M Barreira, et al., Food Chem, 2016, 207, 51-59.
- [5] R Carle, R M Schweiggert, Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages, 1st ed., 2016, Woodhead Publishing
- [6] M Ramesh, A Muthuraman, In Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes, A M Grumezescu, A M Holban Eds., 2018, Academic Press, pp 1-28.
- [7] J Alarcón-Alonso, A Zamilpa, F A Aguilar, et al., J Ethnopharmacol, 2012, 139, 751-756.
- [8] C Beye, S Hiligsmann, L S Tounkara, P Thonart, Agron Africaine 2017, 29, 63-68.
- [9] C Salazar-González, F T Vergara-Balderas, A E Ortega-Regules, J Á Guerrero-Beltrán, Cienc Investig Agrar, 2012, 39, 79-90.
- [10] B H Ali, N Al Wabel, G Blunden, Phytother Res, 2005, 19, 369-375.
- [11] I Da-Costa-Rocha, B Bonnlaender, H Sievers, et al, Food Chem, 2014, 165, 424-443.
- [12] M Marić, A N Grassino, Z Zhu, et al., Trends Food Sci Technol, 2018, 76, 28-37.
- [13] I Jabeur, N Martins, L Barros, et al., Food Funct, 2017, 8, 975-984.
- [14] J Pinela, M A Prieto, E Pereira, et al., Food Chem, 2019, 275, 309-321.
- [15] J Pinela, M A Prieto, M F Barreiro, et al., Food Bioprod Process, 2016, 98, 283-298.

Quantification of L-theanine in Azorean green and black tea: psychoactive amino acid with beneficial impact on cognitive functions

Miguel Rato^{a,b}, Lisete Paiva^c, José Baptista^{a,*}

^aFaculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade dos Açores, Ponta Delgada, S. Miguel, Açores, Portugal

^bFaculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

^cPlantações de Chá Gorreana, Gorreana, Maia, S. Miguel, Açores, Portugal

*jose.ab.baptista@uac.pt

Keywords: *Camellia sinensis*; L-theanine; green and black tea; HPLC

ABSTRACT

The objective of this study was to compare the L-Theanine (L-Thea) levels in commercial green and black tea from S. Miguel, Azores, “unique” local in Europe where tea is produced. L-Thea content in tea samples was determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography using a diode array detector (at 338 nm) after *o*-phthaldialdehyde derivatization. The results showed an average level of 2.96 g/100 g dry weight (DW) for green tea and 1.76 g/100 g DW for black tea revealing that different types of Azorean tea (green and black) present different amounts of L-Thea. In conclusion, since L-Thea presented effects in reducing the stress, anxiety and the brain vascular disorders, the production of a new type of Azorean L-Thea-rich green tea will be a natural alternative to synthetic pharmacologic drugs and possibly with less secondary effects.

1. INTRODUCTION

Historically, tea from *Camellia sinensis* has been consumed by the Chinese and Japanese populations for centuries, and is probably the most consumed beverage besides water for its pleasant taste, cultural significance, low retail price and relaxation effect [1]. Most of these qualities can be attributed to a unique, neurologically-active amino acid called L-theanine (L-Thea). L-Thea, a free amino acid found almost exclusively in *Camellia sinensis*, crosses the hematoencephalic barrier, without metabolic alterations, reaching the brain in less than 30 min after ingestion. The calming effect of green tea may seem contradictory to the stimulant property of tea's xanthines (caffeine, etc.) content that can be explained by the L-Thea action. It acts antagonistically against the xanthines on the nervous system via two different mechanisms. First, L-Thea directly stimulates the production of alpha brain waves, creating a state of deep relaxation and mental alertness. Second, L-Thea is involved in the formation of the inhibitory neurotransmitter, γ -aminobutyric acid that influences the release of the two other neurotransmitters, serotonin and dopamine, producing the key relaxation effect [2-5]. For green tea, the fresh tea leaves from the *C. sinensis* plant are steamed and dried to inactivate the polyphenol oxidase enzyme, a process that essentially maintains the polyphenols in their monomeric forms. Black tea, on the other hand, is produced by extended fermentation of tea'

leaves which results in the polymeric compounds, thearubigins and theaflavins [1]. Taking all of these in mind, the objective of this study was to compare the L-Thea levels in commercial green and black tea samples from S. Miguel, Azores, “unique” local in Europe where tea is produced.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

Standard L-theanine (lot 606121) used in this study was generously donated by Taiyo Kagaku International Inc. (Boise, ID). Amino acid (AA) standard mixture and *o*-phthaldialdehyde (OPA) were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). B-mercaptoethanol, potassium monobasic phosphate, sodium acetate and sodium phosphate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Acetonitrile, tetrahydrofuran (THF) and methanol, HPLC-grade, were purchased from Riedel-de-Häen (Seelze, Germany) and other chemical and solvents were analytical grade. Deionised water was obtained from an in-house Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. Sample collection, preparation and extraction

Samples of green and black tea from Azorean *C. sinensis* were provided by Gorreana Tea Plantation (Azores). A 500 mg amount of dried samples, which have been grounded, were steeped at 70 °C for 15 min in 50 mL of distilled water. The extraction was repeated three times and the solution of the combined extracts, after cooling for 10 min, was filtered under vacuum through a 0.45 µm (pore size) cellulose acetate membrane to remove particulate matter, dried in a vacuum rotatory evaporator at 40 °C and reconstituted with distilled water in a 25 mL volumetric flask. A 50 µL aliquot of solution was used for analysis by HPLC/DAD after pre-column derivatization as described in Section 2.3. The L-theanine stock solution was prepared at final concentration of 40 µg/mL.

2.3. Sample derivatization with OPA for HPLC analysis

The OPA reagent was prepared according to the method published by Baptista et al. [1]. The OPA-reagent was kept overnight before use. A 50 µL of the extracts, standards or control (distilled water), diluted with the same volume of distilled water, were derivatised with 50 µL of OPA reagent for 4 min. The reaction was stopped by the addition of 100 µL of 0.4 M potassium monobasic phosphate (pH 4.0). An aliquot of 10 µL was injected onto the RP-C18 column for analysis.

2.4. HPLC/DAD analysis

The HPLC system consisted of an Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) series 1200 Liquid Chromatograph with diode array detector (DAD). The DAD was fixed at 338 nm. Before the HPLC analysis, the extracts were filtered through a polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane cartridge. An RP-HPLC column, Spherisorb ODS-2 C18 5 µm (150 x 4.6 mm id.) was used with the following eluent system: phase (A) 50 mM sodium acetate plus 50 mM

Na₂HPO₄ (pH 7.5):methanol:THF (96:2:2, v/v/v) and phase (B) methanol:water (70:30, v/v), using the following linear gradient elution: t = 0 min – 25% B, t = 10 min – 25% B, t = 30 min – 40% B and t = 40 min – 100% B, with a flow rate of 0.7 mL/min at the column temperature of 35 °C. The chromatograms were recorded according to the retention time, and the AAs were identified by retention time based on comparison with the authentic standard and/or by spiking the sample with standard. The average of three measurements was used to calculate the AAs extracts content and the results were expressed in mg per g of dry weight (DW).

3. RESULTS AND DISCUSSION

The extraction and OPA derivatization methodology, combined with the reversed-phase HPLC separation, referred in methods, provide an efficient approach for the theanine determination. The stability of the derivatized theanine remained steady when the tea sample was injected immediately after the derivatization reaction. Figure 1 shows the percentage of L-theanine on green and black tea samples of Azorean *C. sinensis* and Figure 2 a HPLC chromatogram of the amino acids profile, including the theanine of the green tea sample. The results (on a dry weight basis) show the L-Thea average level of 2.96 g/100 g DW for green tea and 1.76 g/100 g DW for black tea. These results revealed that different types of Azorean tea (green and black) present different amounts of L-Thea. In fact, the concentration of L-Thea is influenced by the different processing conditions (fermentation, drying temperature and drying time).

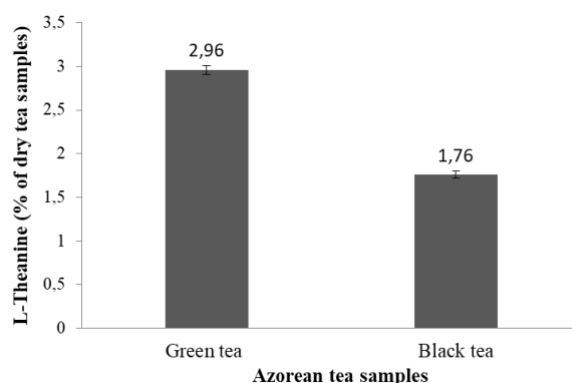


Figure 1. Percentage of L- theanine in green and black tea from Azorean *C. sinensis*.

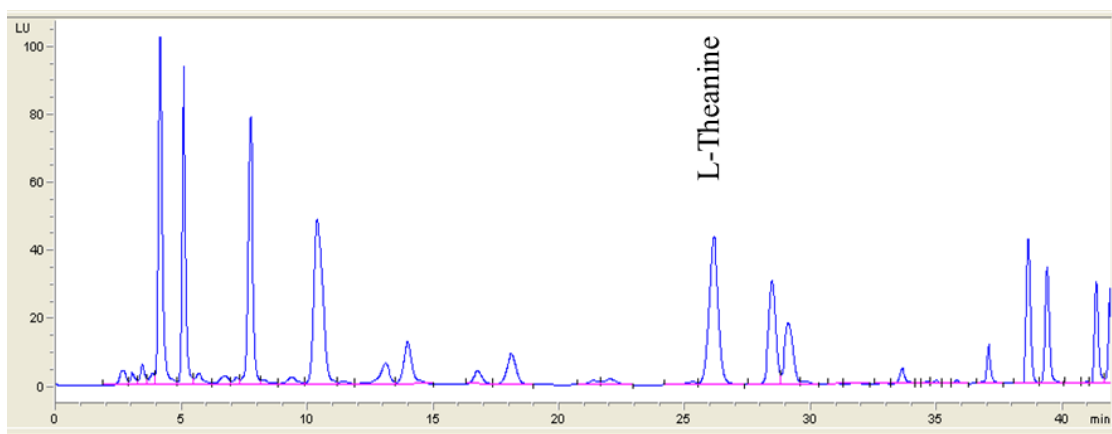


Figure 2. HPLC chromatogram of the amino acids profile of the green tea sample, including the L-theanine amino acid.

4. CONCLUSION

Theanine (a natural glutamate analogue) is one of the flavors components in tea leaves and has received great attention due to its pharmacological attributes, particularly due to the psychoactive properties with beneficial impact on cognitive functions. The present study shows that theanine from tea samples can be quantitatively assessed by HPLC with *o*-phthaldialdehyde derivatization prior analysis. The results show that different grades of Azorean tea (green and black) from the same location, and under the same drying temperature and drying time, present different amounts of theanine showing the negative effect of the fermentation process. On the other hand, a previous study from our research group revealed that the Azorean green tea average theanine content was higher than in green tea samples from China, Japan, Korea and Taiwan [1]. Based on these results, a new type of Azorean green tea, rich in theanine with beneficial effects to humans' health may be produced by modifying the processing conditions.

References

- [1] J Baptista, E Lima, A Andrade, M Alves, L Paiva, *Food Chem*, 2012, 132, 2181–2187.
- [2] DA Camfield, C Stough, J Farrimond, AB Scholey, *Nutr Rev*, 2014, 72, 507–522.
- [3] A Higashiyama, AA Htav, M Ozeki, LR Juneja, MP Kapoor, *J Funct Foods*, 2011, 3, 171–178.
- [4] K Kimura, M Ozeki, LR Juneja, H Ohira, *Biol Psychol*, 2007, 74, 39–45.
- [5] TP Rao, M Ozeki, LR Juneja, *J Am Coll Nutr*, 2015, 34, 436–447.

Avaliação do perfil fenólico de duas plantas comumente utilizadas na medicina tradicional, após aplicação de irradiação ionizante

Eliana Pereira^a, Andreia Pimenta^b, Filipa Mandim^a, Ricardo C. Calhella^a, Amílcar L. Antonio^a, Lillian Barros^a, Celestino Santos-Buelga^c, Sandra Cabo Verde^b, Isabel C.F.R. Ferreira^{a,}*

^aCentro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal;

^b Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Estrada Nacional 10 (km 139,7), 2695-066 Bobadela LRS

^c GIP-USAL, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain.

*iferreira@ipb.pt

Palavras chave: composição fenólica; plantas medicinais; radiação gama

RESUMO

Os compostos fenólicos têm sido associados a diversos efeitos benéficos nomeadamente, na prevenção de algumas doenças, tais como, diabetes, cancro, doenças cardiovasculares, obesidade, doenças neuro-degenerativas, entre outras. São várias as matrizes que representam uma boa fonte deste tipo de compostos, principalmente no reino vegetal. Assim, este estudo pretendeu avaliar os efeitos da radiação gama na composição fenólica de extratos aquosos, obtidos por infusão de duas plantas comumente apreciadas pelo consumidor e usadas na medicina tradicional - *Aloysia citrodora* L. (limonete) e *Mentha x piperita* L. (hortelã-pimenta). O tratamento de irradiação foi realizado através de uma câmara de ⁶⁰Co, aplicando as doses de 1 e 10 kGy e os resultados foram comparados com amostras controlo (0 kGy). O perfil fenólico foi obtido por HPLC-DAD-ESI/MS. Foram identificados 11 e 14 compostos fenólicos (derivados de flavonoides e ácidos fenólicos) nas espécies *A. citrodora* e *M. piperita*, respetivamente. Relativamente aos resultados obtidos após a aplicação deste tipo de processamento, foi evidente que as amostras submetidas a uma dose de irradiação de 10 kGy, revelaram diferenças estatisticamente significativas no perfil fenólico de ambos os extratos estudados, comparativamente com a amostra controlo (0 kGy), evidenciando um aumento na maioria dos compostos, como também nos teores de ácidos fenólicos totais e compostos fenólicos totais. Assim, este estudo contribuiu para um conhecimento mais amplo dos efeitos da irradiação gama nestas moléculas, revelando também que este tipo de processamento pode ser aplicado em plantas aromáticas e medicinais.

1. INTRODUÇÃO

A crescente procura de dietas mais saudáveis e a utilização de produtos naturais na prevenção e/ou tratamento de diversos problemas de saúde, têm desencadeado vários estudos de prospeção de compostos bioativos em plantas [1]. As plantas aromáticas e medicinais têm-se apresentado como uma fonte rica de inúmeros compostos nomeadamente, compostos fenólicos, terpenoides, alcaloides, quinonas, e outros compostos contendo enxofre, o que lhes atribui um elevado potencial bioativo. Os compostos fenólicos são moléculas com um grande potencial antioxidante devido à sua capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigénio e quelatar iões metálicos [2]. Os compostos fenólicos mais comuns são os flavonoides e os ácidos fenólicos, exibindo propriedades bioativas nos sistemas cardiovascular, nervoso e

gastrointestinal, nomeadamente através de efeitos anti-hipertensivos, anti-inflamatórios, imunomoduladores e hepatoprotetores [3].

No entanto, as plantas sofrem facilmente contaminações, sendo absolutamente essencial a aplicação de técnicas para eliminar microrganismos, como fungos e bactérias, insetos e outros, o que torna indispensável o uso de metodologias de descontaminação seguras para os consumidores e para o ambiente [4]. Deste modo, a irradiação consiste numa tecnologia de descontaminação e preservação segura e não térmica, adequando-se a várias matrizes alimentares, incluindo ervas medicinais e especiarias [4].

Estudos realizados comprovaram que a aplicação de radiação gama a diferentes espécies de plantas preserva as suas propriedades químicas e nutricionais [4]. Neste sentido, e a fim de aprofundar esta temática, o presente estudo pretende avaliar os efeitos da radiação gama (nas doses 1 e 10 kGy) sobre a composição fenólica de duas plantas comumente apreciadas pelo consumidor e usadas tradicionalmente para fins medicinais - *Aloysia citrodora* L. (limonete) e *Menta x piperita* L. (hortelã-pimenta).

1. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparação e irradiação das amostras

As amostras secas de *Aloysia citrodora* Paláu (limonete) e *Mentha piperita* L. (hortelã-pimenta) foram fornecidas por um produtor local - Pragmático Aroma Lda (Alfândega da Fé, Bragança, Portugal). Após serem trituradas para a obtenção de um pó homogêneo, as amostras foram divididas equitativamente em 3 porções - controlo (não-irradiadas, 0 kGy), e amostras para irradiar com diferentes doses (1 e 10 kGy).

A irradiação gama foi realizada no Centro de Tecnologia Nuclear (Lisboa, Portugal), numa câmara experimental com fontes de ^{60}Co (Precisa 22, Graviner Manufacturing Company Ltd., UK) com a atividade de 177 TBq (4,78 kCi), usando diferentes tipos de dosímetros de referência e de rotina, tais como dosímetros de Fricke, preparados no laboratório, e Amber Perspex (Harwell Company, Oxfordshire, UK) [4].

2.2. Avaliação do perfil fenólico das amostras

O perfil fenólico foi avaliado nas infusões obtidas a partir do material seco das espécies acima referidas. Para tal, a infusão (extrato aquosos) foi preparada de acordo com a metodologia descrita por Barros et al. [5]. O referido extrato foi analisado através de um sistema de HPLC-DAD (Hewlett-Packard 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US), acoplado a ESI/MS (API 3200 Qtrap, Applied Biosystems, Darmstadt, Germany), e a identificação dos compostos foi realizada de acordo com o descrito por Barros et al. [5]. Os resultados foram expressos em μg por mL de infusão.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos das amostras não irradiadas (0 kGy) e irradiadas (1 e 10 kGy) apresentam-se na **Tabela 1**. Nas amostras de limonete analisadas foram identificados onze compostos fenólicos, dos quais quatro flavonoides (picos 2, 4, 6 e 9), seis derivados de cafeoil feniletanóides (incluindo verbasósido) (picos 1, 5, 7, 8, 10 e 11) e um ácido fenólico (pico 3).

Tabela 1. Tempo de retenção (Tr), comprimento de onda de absorvância máxima na região do visível (λ_{\max}), informação dos espectros de massa, tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos em infusões de limonete e hortelã-pimenta preparadas a partir de amostras não irradiadas e irradiadas (média \pm desvio padrão).

| Pico | Tr (min) | λ_{\max} (nm) | [M-H] ⁺ (m/z) | MS ² (m/z) | Tentativa de identificação | Quantificação (µg/mL) | | | |
|-----------------|----------|-----------------------|--------------------------|---|-------------------------------|---|-----------------|---------------|------------|
| | | | | | | 0 kGy | 1 kGy | 10 kGy | |
| Limonete | | | | | | | | | |
| 1 | 4,1 | 280 | 461 | 315(8),135(28) | Verbasósido | 2,6 ± 0,5 a | 2,9 ± 0,4 a | 2,4 ± 0,4 a | |
| 2 | 15,0 | 344 | 637 | 351(100),285(89) | Luteolina-7-O-diglucurónido | 68,7 ± 0,3 b | 64,2 ± 0,2c | 70,0 ± 0,5a | |
| 3 | 16,7 | 314 | 163 | 119(100) | Ácido <i>p</i> -cumárico | 2,1 ± 0,1 b | 2,2 ± 0,1b | 2,5 ± 0,1a | |
| 4 | 18,0 | 338 | 621 | 351(100),269(20) | Apigenina-7-O-diglucurónido | 9,5 ± 0,2 a | 9,9 ± 0,1a | 10,1 ± 0,6a | |
| 5 | 18,2 | 330 | 623 | 461(18), 315(5) | Verbascósido | 114 ± 2 b | 83 ± 2c | 134 ± 1a | |
| 6 | 20,2 | 350 | 651 | 351(100), 299(5) | Criseoeriol-7-O-diglucurónido | 10,4 ± 0,1 a | 9,3 ± 0,4 b | 9,5 ± 0,3 b | |
| 7 | 20,4 | 330 | 623 | 461(18), 315(5) | Isoverbascósido | 1,2 ± 0,1 b | 1,5 ± 0,3 ab | 1,7 ± 0,1a | |
| 8 | 21,2 | 330 | 623 | 461(15), 315(10) | Forsitósido | 27 ± 1a | 21,9 ± 0,6 b | 19 ± 2c | |
| 9 | 21,8 | 350 | 491 | 315(100),300(23) | Isoramnetina-7-O-glucurónido | 4,4 ± 0,1a | 4,36 ± 0,06 a | 4,44 ± 0,07 a | |
| 10 | 23,1 | 330 | 637 | 491(5),461(60), 315(13) | Eucovósido | 1,00 ± 0,01a | 0,9 ± 0,1ab | 0,8 ± 0,1b | |
| 11 | 29,2 | 330 | 651 | 505(7),475(22) | Martinósido | 0,52 ± 0,06a | 0,40 ± 0,01b | 0,56 ± 0,03 a | |
| | | | | | | Derivados de cafeoil feniletanóide totais | 146,0 ± 0,1b | 111 ± 1c | 159 ± 2 a |
| | | | | | | Ácidos fenólicos totais | 2,1 ± 0,1b | 2,2 ± 0,1b | 2,4 ± 0,1a |
| | | | | | | Flavonoides totais | 92,9 ± 0,1a | 87,7 ± 0,4 b | 94 ± 1a |
| | | | | | | Compostos fenólicos totais | 241,04 ± 0,01 b | 201 ± 1c | 255 ± 4 a |
| Hortelã-pimenta | | | | | | | | | |
| 1´ | 5,3 | 328 | 353 | 191(100),179(27),173(5),161(15),135(30) | Ácido-3-O-cafeoilquinico | 1,5 ± 0,1b | 1,03 ± 0,03c | 2,34 ± 0,01a | |
| 2´ | 7,2 | 328 | 353 | 191(100),179(90),173(50),161(20),135(57) | Ácido-5-O-cafeoilquinico | 1,7 ± 0,1b | 1,54 ± 0,02b | 4,4 ± 0,3a | |
| 3´ | 11,3 | 326 | 179 | 135(100) | Ácido cafeico | 0,4 ± 0,2b | 0,32 ± 0,01 b | 3,0 ± 0,3a | |
| 4´ | 14,7 | 348 | 637 | 285(100) | Luteolina-O-di-hexósido | 16,45 ± 0,04c | 18,7 ± 0,3b | 19,9 ± 0,7a | |
| 5´ | 16,1 | 288,330sh | 537 | 493(45),313(18),295(36),269(55),197(36),179(64),135(100) | Trímero de ácido cafeico | 6,0 ± 0,3c | 9,0 ± 0,2* | 7,2 ± 0,3b | |
| 6´ | 16,3 | 284,332sh | 595 | 287(100) | Eriodictiol-7-O-rutinósido | 127 ± 2c | 170 ± 6b | 205 ± 3a | |
| 7´ | 17,5 | 286,336sh | 449 | 287(100) | Eriodictiol-O-hexósido | 2,7 ± 0,2 b | 2,30 ± 0,03c | 5,2 ± 0,3a | |
| 8´ | 19,4 | 350 | 593 | 285(100) | Luteolina-7-O-rutinósido | 34,4 ± 0,3b | 34,5 ± 0,1b | 41 ± 1a | |
| 9´ | 20,2 | 348 | 461 | 285(100) | Luteolina-7-O-glucurónido | 15,2 ± 0,5b | 17,8 ± 0,3b | 20 ± 1a | |
| 10´ | 20,5 | 282,330sh | 579 | 271(100) | Naringenina-O-rutinósido | 4,5 ± 0,2b | 3,76 ± 0,04c | 6,2 ± 0,1a | |
| 11´ | 21,9 | 278,338sh | 717 | 537(34),519(50),493(39),339(29),321(37),313(6),295(100),197(3),179(11),161(5),135(11) | Ácido salvianolico B/E/L | 20,6 ± 0,5c | 21,7 ± 0,1b | 27,6 ± 0,2a | |
| 12´ | 23,2 | 286,338sh | 609 | 301(100) | Hesperetina-O-rutinósido | 5,8 ± 0,2b | 5,7 ± 0,1b | 11,0 ± 0,3a | |
| 13´ | 24,1 | 330 | 359 | 197(13),179(20),161(100),135(21) | Ácido rosmarínico | 34 ± 1b | 35,1 ± 0,4b | 51 ± 1a | |
| 14´ | 24,5 | 288,340sh | 493 | 313(5),295(100),279(3),197(14),179(8),135(5) | Ácido salvianólico A | 15,7 ± 0,5b | 17,9 ± 0,4b | 23 ± 2a | |
| | | | | | | Ácidos fenólicos totais | 80 ± 3c | 86,6 ± 0,5b | 119 ± 1a |
| | | | | | | Flavonoides totais | 206 ± 4c | 253 ± 6b | 308 ± 6a |
| | | | | | | Compostos fenólicos totais | 286 ± 7c | 340 ± 7b | 427 ± 6a |

O composto detetado em maior abundância foi o verbascósido (pico 5), com uma concentração que variou entre 83 e 134 µg/mL de infusão. Este composto tem sido descrito por apresentar uma forte atividade antioxidante, devido à presença de dois grupos catecol na sua estrutura [6]. Tendo em conta os efeitos das diferentes doses de irradiação na concentração dos compostos, foi evidente uma degradação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) das moléculas de criseoeriol-7-O-diglucuronídeo (pico 6), forsitósido (pico 8) e eucovósido (pico 10) com a dose de 10 kGy. Contrariamente, a mesma dose de radiação, aumentou a extratabilidade dos compostos luteolina-7-O-diglucuronídeo (pico 2), ácido *p*-cumárico (pico 3), verbascósido (pico 5) e isoverbascósido (pico 7).

Relativamente às infusões das amostras de hortelã-pimenta, foram detetados sete ácidos fenólicos (picos 1', 2', 3', 5', 11', 13' e 14') e sete flavonoides (picos 4', 6', 7', 8', 9', 10' e 12'). Na presente avaliação, foi evidente a elevada concentração de eriodictiol-O-rutinósido (pico 6'), comparativamente com os restantes compostos detetados, tendo este composto, um potencial bioativo relevante, particularmente em termos de atividade neutralizadora de

radicais livres intracelulares [7]. Analisando os efeitos da irradiação no perfil fenólico desta espécie, salientou-se um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na concentração de todos os compostos fenólicos detetados na amostra irradiada com a dose de 10 kGy, com a exceção do trímero de ácido cafeico (pico 5'), cuja concentração foi mais elevada na amostra submetida à dose de 1 kGy.

Todas estas variações nos teores das biomoléculas detetadas podem depender de diferentes fatores (dose de irradiação aplicada, tempo de armazenamento ou espécie da amostra) e poderá ser explicado pelo aumento da atividade enzimática, que favorece a libertação de compostos ligados à matriz e/ou a uma maior extratabilidade dos compostos por degradação dos tecidos da parede celular da planta [8].

3. CONCLUSÃO

As amostras de limonete e hostelã-pimenta mostraram uma variação estatisticamente significativa na concentração de compostos fenólicos, dependendo da espécie e da dose de irradiação aplicada. Assim, os resultados deste estudo podem contribuir para um conhecimento mais amplo dos efeitos da irradiação gama na composição de moléculas de elevado interesse bioativo em plantas aromáticas e medicinais.

Agradecimentos

FCT, Portugal e ao FEDER no âmbito do programa PT2020 pelo apoio financeiro ao CIMO (UID/AGR/00690/2013) e CTN (RECI/AAG-TEC/0400/2012) e contracto de L. Barros; Programa FEDER-Interreg Espanha-Portugal pelo apoio financeiro através do projeto 0377_Iberphenol_6_E.

Referências

- [1] R Gerson-Cwilich, A Serrano-Olvera, A Villalobos-Prieto, Clin Transl Oncol, 2006, 8, 200-7.
- [2] PS Port's, RC Chisté, HT Godoy, MA Prado, Food Res Int, 2013, 53, 875-881.
- [3] BA Acosta-Estrada, JA Gutiérrez-Urbe, SO Serna-Saldívar, Food Chem, 2014, 152, 46-55
- [4] E Pereira, AL Antonio, JCM Barreira, J.C.M.,... et al, Food Res Int, 2015, 67, 338-348.
- [5] L Barros, E Pereira, RC Calhelha, M Duenas,...et al, J Funct Foods, 2013, 5, 1732-1740.
- [6] M D'Imperio, A Cardinali, I D'Antuono, V Linsalata,... et al., Food Res. Int. 2014, 66, 373–378.
- [7] M-B Imen, F Chaabane, M Nadia, K-J Soumaya,... et al., Life Scie, 2015, 135, 173-178.
- [8] M Alothman, R Bhat, AA Karim, Trends Food Scie Technol, 2009, 20, 201-212.

Gastrointestinal Absorption of Anthocyanins: A Molecular Approach

Hélder Oliveira, Iva Fernandes*, Victor de Freitas and Nuno Mateus

REQUIMTE/LAQV, Chemistry and Biochemistry Department, Faculty of Sciences University of Porto, Portugal

**iva.fernandes@fc.up.pt*

Keywords: anthocyanins, transepithelial transport, purple-fleshed sweet potato, red wine

1. INTRODUCTION

Anthocyanins are naturally occurring bioactive compounds that are extensively distributed in plant-derived foodstuffs and, consequently, largely consumed by humans. Their consumption is related to decreased risks of developing cardiovascular disease and cancer (1). Amongst polyphenols classes, anthocyanins are the ones considered to have the lowest bioavailability. However recent reports suggest an undervaluation of the real bioavailability of these compounds.

An early appearance of anthocyanins in blood and urine after consumption of anthocyanin-rich foods, is not compatible with an exclusive absorption at the intestinal level, as initially acknowledged (2). Bioavailability is highly dependent on the interactions between food components when ingested together (3). However, only limited scientific evidences exist to provide information on the bioavailability of anthocyanins in the gut.

Thus, this study aimed to better understand the influence of food matrix components on anthocyanin absorption and molecular mechanisms potentially involved on their bioavailability.

2. MATERIALS AND METHODS

MKN-28 and Caco-2 cells were plated on 12-well *Transwell*[®] polycarbonate permeable inserts, 12 mm diameter, 0.4 µm pore size tissue culture inserts (Corning Costar, Corning, NY) at 75 % confluence (Figure 52). Cells were cultured during 7 days (MKN-28) or 21 days (Caco-2) at 37 °C in an atmosphere of 5 % CO₂ and the medium was changed every two days. After the grown of cells (7 or 21 days) to reach a monolayer, the medium was removed and cells were washed with HBSS: pH 7.4 at the basolateral side and with HBSS pH 5.0 or 7.4 (MKN-28 or caco-2, respectively) at the apical side. For caco-2 cells, 24h prior to the experiments, the medium was replaced by fresh medium without foetal bovine serum (FBS). The anthocyanin solutions prepared in HBSS pH 5.0 or pH 7.4 at different concentrations were added to the apical side of the cells and HBSS containing 2 % FBS free of polyphenols was added to the basolateral compartment. Transepithelial transport was followed as a function of time, at 37 °C. Samples were taken from the basolateral side and replaced by fresh medium at 30', 60' 120' minutes for caco-2 cells and 30', 60' 120' and 180' minutes for MKN-28 cells. The samples (150 µL) were acidified with HCl 6 M to a final concentration of 1 % and frozen at -18 °C until

HPLC analysis. The effect of the processes occurring during a normal digestion on anthocyanins stability after ingestion was evaluated. Anthocyanins extracts from both PFSP and red wine were used to test the stability behaviour of acyl substituents during gastrointestinal digestion. Furthermore, the effect of food matrix on anthocyanin stability was also evaluated. Several concentrations of extracts were tested, based on the probable number of *in vivo* anthocyanins (from an average consumption of 200 g of PFSP and 200 mL of Red Wine) at a given time point (10 min for salivary phase, 180 min for gastric phase, 120 min for intestinal phase). Before transport experiments with silenced glucose transporters and to further confirm that the addition of nanoconjugates did not affect cellular barrier integrity and cells toxicity, MKN-28 cells were seeded on 6.5 mm transwell inserts, 0.4 µm pore size, using 8W TransFilter Adapter of ECIS system (Applied Biophysics, Troy, NY, USA). Cells were grown to confluence and transepithelial electrical resistance (TEER) was continually measured. To further confirm the silencing efficacy of the nanoconjugates at the protein level in the transwell plates, cells were gently detached from the transwell membrane with PBS, centrifuged (500 x g for 5 min) and solubilized in lysis buffer for Western-Blot procedure, as described above. After this treatment, media was removed and cells were washed with Hanks' medium (HBSS), pH 7.4 at the basolateral side and with HBSS pH 5.0 at the apical side. Anthocyanin solution (500 µM) in HBSS pH 5.0 was added to the apical side of the cells and HBSS containing 2 % fetal bovine serum free of polyphenols was added to the basolateral compartment. Transepithelial transport was followed as a function of time, at 4°C and 37 °C. Samples were taken from the basolateral side and replaced by fresh medium. The samples (150 µL) were acidified with HCl 6 M to a final concentration of 1 % and frozen at -18 °C until HPLC analysis.

3. RESULTS

The kinetics of absorption both at gastric and intestinal level using MKN-28 and caco-2 cancer cell lines, was evaluated for complex anthocyanins from purple fleshed sweet potato, which revealed higher absorption values than previously reported for other anthocyanins.

Food matrix evaluation using anthocyanin-rich extracts from purple fleshed sweet potato showed a decreased efficiency of anthocyanin absorption in the presence of glucose and proteins but not starch.

Recent evidence suggested the involvement of glucose transporters at gastric level on anthocyanins absorption (4). Thus, the molecular mechanism of absorption of anthocyanins on the stomach was evaluated using gene silencing with a nano-technological approach. The results, for different anthocyanins with particular structural features, extracted from both red wine and purple fleshed sweet potato, suggested the involvement of GLUT1 and GLUT3 transporters, although the transport mechanism was not exclusive to these transport systems. Also, a simulation of gastrointestinal enzymatic action was performed to evaluate the first line of anthocyanin degradation.

These results bring new insights on the comprehension of anthocyanins bioavailability.

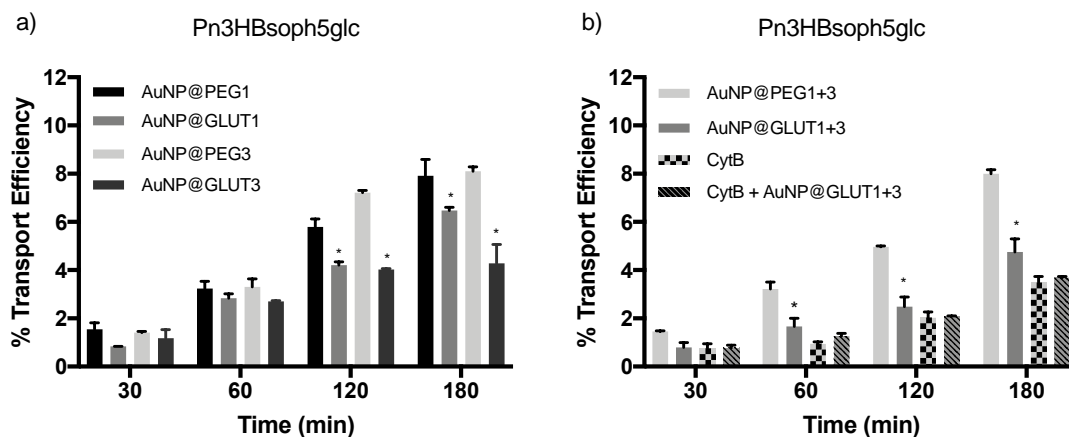


Figure 2. Transport efficiency of Pn3HBsoph5glc through MKN-28 barrier (Apical → Basolateral). The experiments were conducted with apical pH 5.0 and basolateral pH 7.4 in the presence of 30 nM AuNP@GLUT1, 20 nM AuNP@GLUT3, or 0.75 nM AuNP@PEG (control of AuNP@GLUT1) or 0.63 nM AuNP@PEG (control of AuNP@GLUT3), 1.38 nM AuNP@PEG (control of AuNP@GLUT1+3), a mixture of AuNP@GLUT1+3, Cythochalasin B (CytB, 50 μ M) or a mixture of AuNP@GLUT1+3 and Cythochalasin B (50 μ M). Significantly different from respective free oligonucleotide nanoparticle treatment * $p < 0.05$

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank FCT and M2B-PhD for the PhD grant (PD/BD/106062/2015)

BIBLIOGRAPHY

1. Murador, D., Braga, A.R., Da Cunha, D., De Rosso, V., Alterations in phenolic compound levels and antioxidant activity in response to cooking technique effects: a meta-analytic investigation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (2016), pp. 1-9
2. Fernandes, I., Faria, A., Calhau, C., de Freitas, V., Mateus, N., Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *J. Funct. Foods*, 7 (2014), pp. 54-66
3. Phan, M. A. T., Paterson, J., Bucknall, M., & Arcot, J. Interactions between phytochemicals from fruits and vegetables: Effects on bioactivities and bioavailability. *Critical Rev. in Food Sci. and Nutrition* (2016), pp. 1-20.
4. Oliveira, H., Fernandes, I., Brás, N. F., Faria, A., de Freitas, V., Calhau, C., Mateus, N., Experimental and theoretical data on the mechanisms by which red wine anthocyanins are transported through a human MKN-28 gastric cell model. *J. Agr. Food Chem.* (2015)

Physical and Chemical Characterization of Anthocyanins from Purple-Fleshed Sweet Potato

Hélder Oliveira, Iva Fernandes*, Victor de Freitas and Nuno Mateus

REQUIMTE/LAQV, Chemistry and Biochemistry Department, Faculty of Sciences University of Porto, Portugal

**iva.fernandes@fc.up.pt*

Keywords: Anthocyanins, fluorescence, purple-fleshed sweet potato

1. INTRODUCTION

Anthocyanins represent one of the most amazing classes of compounds among polyphenols. These molecules have unique characteristics such as their structural dependence on pH [1]. The kinetic and equilibrium network of anthocyanins has been widely assessed in order to understand their behavior and stability under different pH conditions.

Among the different types of anthocyanins, Purple-Fleshed Sweet Potato (PFSP) anthocyanins primarily exist as poly-acylated and poly-glycosylated structures derived from Peonidin and Cyanidin [2]. Acylation with various phenolic acids makes PFSP anthocyanins unique and also provides some advantages towards pH and heat resistance, light sensitivity, and overall stability [3], as anthocyanins are known to be reactive compounds that have their stability affected by oxygen, heat, light, pH and enzymes [4]. The study of their equilibrium network is therefore essential. Also, anthocyanins are reported to have poor light-emitting properties, however the scarce information on this matter was performed with monoglucosides and non acylated anthocyanins [5].

Thus, the aim of this study was to characterize the physical and chemical properties of anthocyanins from red wine.

2. MATERIALS AND METHODS

For that, a structural characterization of two main Purple-Fleshed Sweet Potato anthocyanins was performed using LC-MS and NMR techniques. The study of the equilibrium network was performed with the use of *pH jump* techniques and the fluorescence properties of the two isolated anthocyanins were also assessed.

The pH titration of PFSP Anthocyanins was performed by UV–visible spectroscopy using the pH jump technique from pH = 1 to higher pH values depending on the experiment.

For that, stock solutions of 1×10^{-4} M of each anthocyanin were prepared in 0.1 M HCl. Then to a plastic 10×10 mm cuvette were added 500 μ L of a 0.1 M NaOH solution and 500 μ L of a Theorell and Stenhagen universal buffer solution adjusted to the desired pH value. At the end, 500 μ L of the stock solutions equilibrated at pH 1.0 (flavylium cation form) were added to the cuvette. The absorption spectra of the different solutions were obtained after approximately 60 min (pseudoequilibrium acidity constant, pK^a) after the pH jump (from pH 1.0 to the pH of the universal buffer solution) in a Varian-Cary 100 Bio spectrophotometer. The fittings for pK^a and $pK'a$ determination were carried out using the Solver program from Microsoft Excel. Direct and reverse pH jumps experiments were conducted in an Applied Photophysics SX20 stopped-flow spectrophotometer provided with a PDA.1/UV photodiode array detector with a minimum scan time of 0.65 ms and a wavelength range of 200 to 735 nm. The fluorescence properties of the two PFSP anthocyanins were evaluated with a spectrofluorometer FluoroMax®-4 (HORIBA Scientific) in a QS High Precision Cell made of quartz SUPRASIL with a length path of 3 x 3 mm (Hellma Analytics). All the solutions were used in dilutions to match an absorbance of about 0.1 in the 510-530 nm spectral region. All fluorescence spectra were corrected for the spectral response of the spectrofluorometer emission and excitation units. Both anthocyanins were analysed at different pH values (from 1 to 11) at a concentration of 25 μ M. For all the experiments both the front and exit entrance slits consisted of a 5 nm bandpass. Both excitation and emission spectrum were recorded for each anthocyanin at different pH values.

For the imaging experiments, MKN-28 and Caco-2 cells were maintained in culture, and grown as monolayers and maintained at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ and 90 % relative humidity. When the cells were ready to subculture, they were washed with Phosphate Buffer Saline (PBS), and detached from the culture flask with 0.25 %, w/v, trypsin–EDTA4–Na. After that, a dilution (1:20) was performed and the cells were seeded in 35 mm glass-bottom dishes divided in 4 chambers (μ -Dish 35 mm Quad – Ibidi, Germany) suitable for microscopy analysis. 500 μ L of cells suspension was added to each chamber. After 24 hours, the complete medium was removed and the attached cells were washed 3 times with Hanks solution pH 7.4 and the PFSP extracts were applied. The extracts were diluted in Hanks solution at a final concentration of 100 μ M and 250 μ L were added to each chamber. The incubation time with each cell line was 3 hours. After that, the cells were washed in PBS 3x and membrane fluorescent stain diluted in PBS was applied: CellMask™ Green Plasma Membrane Stain at a final concentration of 2,5 μ g. mL⁻² (50 μ L were added to each chamber). Hanks solution was added to each chamber (250 μ L) and the live cells were observed with a Leica TCS SP5 II (Leica Microsystems, Germany) laser confocal scanning microscope for study the intracellular localization of the anthocyanins. The ex/em pairs of CellMask™ Green Plasma Membrane Stain and PFSP anthocyanins were 525/535 nm and 610/640 nm, respectively. The post treatment of the images was performed with Fiji (ImageJ) software. All the images, controls and experiments, for both cell lines, were treated with the same colour, brightness and contrast parameters.

3. RESULTS

The results suggested a higher stability at a broader range of pH values (with lower hydration and higher acidity constants) of the isolated anthocyanins when compared to the already published kinetic and equilibrium parameters of the parent non acylated anthocyanin. These results suggest potential technological applications of these type of anthocyanins, due to the maintenance of both red and blue colors. Also, unique fluorescence properties were reported for the anthocyanins of PFSP for the first time with an ex/em pair of λ_{ex} 610 nm/ λ_{em} 640 nm. A biological experiment was performed using gastric and intestinal cell lines, and PFSP anthocyanins intracellular localization was performed with the use of fluorescence microscopy techniques. The results revealed an irregular distribution of the compounds within the cells. This suggest that anthocyanins are preferably located in preferred areas, which may be due to their biological activities.

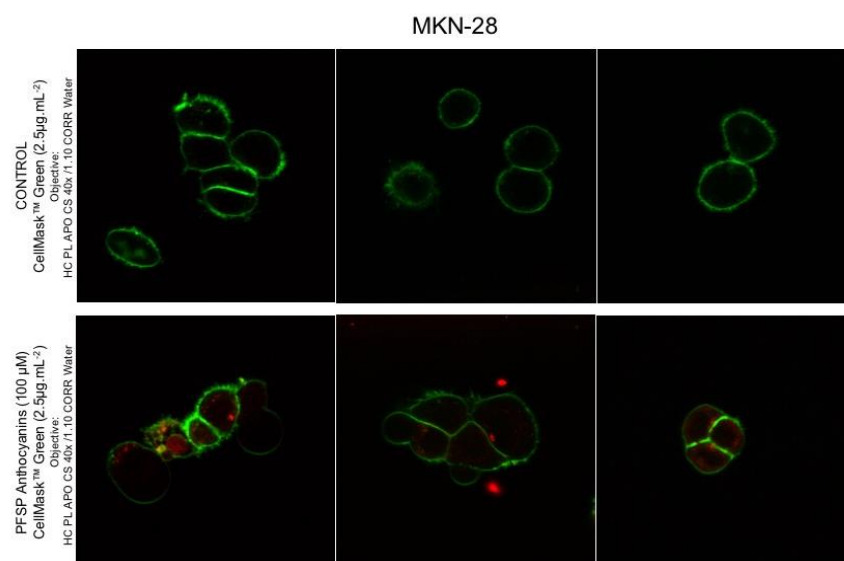


Figure 3. Live-cell imaging of the intracellular localization of PFSP anthocyanins in MKN-28 and caco-2 cells by Laser Confocal Scanning Microscopy analysis. Selected optical planes from MKN-28 cells where green stains for the plasma membrane; red stains for the PFSP anthocyanins. Cells were treated with anthocyanins for 3 hours, and then stained with CellMask™ Green for 5 min before the microscope analysis. The lasers used on the analysis were: Diode 405nm; Ar 458, 476, 488, 496, 514 nm; DPSS561 561nm; HeNe 633nm. All the images were collected at 40x magnitude with a HC PL APO CS 40x/1.10 CORR Water. The ex/em pairs of CellMask™ Green Plasma Membrane Stain and PFSP anthocyanins were 522/535 nm and 610/640 nm, respectively. All the images were treated the same way on brightness and contrast parameters.

All the RGB values were kept the same. To the composite of each image was removed the channel corresponding to the bright field.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank FCT and M2B-PhD for the PhD grant (PD/BD/106062/2015)

BIBLIOGRAPHY

1. Pina, F., *Chemical applications of anthocyanins and related compounds. A source of bioinspiration*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **62**(29): p. 6885-97.
2. Gould, K., K.M. Davies, and C. Winefield, *Anthocyanins: Biosynthesis, functions and applications*. New York: Springer, 2008.
3. Xu, J., et al., *Characterisation and stability of anthocyanins in purple-fleshed sweet potato P40*. Food Chemistry, 2015. **186**: p. 6.
4. Wallace, T. and M. Giusti, *Anthocyanins in Health and Disease* CRC Press, 2014. **ISBN: 978-1-4398-9471-2**.
5. Drabent, R., et al., *Ultraviolet Fluorescence of Cyanidin and Malvidin Glycosides in Aqueous environment*. Spectroscopic Letters, 2007. **40**: p. 165-182.

***Gomphrena globosa* L.: otimização do processo de extração de corantes, avaliação da sua atividade antimicrobiana e incorporação numa matriz alimentar**

Custódio Lobo Roriz^{1,2}, Lillian Barros¹, M.A. Prieto^{1,3}, Patricia Morales², Filipa S. Reis¹, Maria Filomena Barreiro^{1,4}, Isabel C.F.R. Ferreira^{1,}*

¹Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal;

²Dpto. Nutrición y Bromatología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid, Spain;

³Nutrition and Bromatology Group, Faculty of Food Science and Technology, University of Vigo, Ourense, Spain;

⁴Laboratory of Separation and Reaction Engineering—Laboratory of Catalysis and Materials (LSRE-LCM), Universidade do Porto, Porto.

*iferreira@ipb.pt

Palavras chave: *Gomphrena globosa* L.; corante; betacianinas; otimização de extração; incorporação.

RESUMO

Devido à grande preocupação por parte dos consumidores em relação aos aditivos artificiais presentes nos alimentos, a procura de alternativas de origem natural tem vindo a ganhar uma grande importância. Este trabalho, focou-se na otimização de três técnicas de extração, extração assistida por calor (EAC), micro-ondas (EAM) e ultrassons (EAU) de flores de *Gomphrena globosa* L., aplicando uma metodologia de superfície de resposta (MSR), tendo-se estudado os efeitos das variáveis, tempo de processamento (t), temperatura (T) ou potência (P), concentração de etanol (%Et) e razão sólido/líquido (S/L). Como respostas foram utilizados o rendimento de extração e a concentração total de betacianinas determinadas por LC-DAD-ESI/MS. A técnica de extração que apresentou melhores resultados foi a EAU: $t = 22$ min, $P = 500$ W; %Et = 0%, e $S/L = 5$ g/L, conduzindo a um valor de betacianinas totais de $46,9 \pm 4,8$ mg/g [1,2]. Após ter sido determinada a melhor técnica de extração foi aplicada novamente a MSR no sentido de obter um extrato rico em betacianinas com elevada atividade antimicrobiana. As respostas foram avaliadas em termos das concentrações de extrato necessárias para obter os melhores valores de MIC (concentração mínima inibitória do crescimento) e MBC (concentração mínima bactericida). Os resultados indicaram as seguintes condições ótimas: $t = 10,8$ min, $P = 410,5$ W; %Et = 57,8%, e razão $S/L = 5$ g/L, fornecendo as seguintes respostas de MIC ~0,15 a 0,35 g/L e MBC ~0,30 a 0,65 g/L [3]. Este extrato rico em betacianinas e com elevada atividade antimicrobiana, foi incorporado num gelado, tendo-se verificado ao longo do tempo de prateleira (60 dias) a coloração desejada e sem alteração do seu perfil nutricional. Desta forma, foi possível com o extrato aquoso de flores de *G. globosa* atribuir a cor pretendida ao gelado e, simultaneamente, conferi-lhe capacidade antimicrobiana.

1. INTRODUÇÃO

É através da visão que muitas vezes fazemos a primeira avaliação do que nos rodeia, incluindo os produtos alimentares. Assim, a sua aparência é considerada tão importante quanto o seu sabor, sendo esta característica um dos indicadores de qualidade dos produtos. Para tornar determinados alimentos mais atrativos, recorre-se a adição de corantes alimentares, que podem ser classificados em naturais ou artificiais, de acordo com a sua origem. Quando comparados, os corantes naturais têm a desvantagem de possuir genericamente uma menor capacidade corante, serem mais sensíveis às condições ambientais, tais como luz, temperatura, pH, entre outras, mas são na sua grande maioria isentos de efeitos tóxicos ou nocivos para a saúde humana [4]. Devido aos seus efeitos tóxicos, o uso de alguns corantes artificiais tem sido restringido, tornando-se extremamente importante a sua substituição por corantes que sejam mais seguros para o consumidor, nomeadamente algumas alternativas naturais. Abre-se, assim, um novo campo de investigação, relacionado com a prospeção de fontes naturais para obtenção de compostos corantes capazes de suprimir as novas necessidades da indústria alimentar, e assim, satisfazer os consumidores cada vez mais atentos a esta temática. *Gomphrena globosa* L. (perpétua roxa), apesar de pouco explorada, apresenta na sua composição pigmentos da classe das betacianinas. Estes compostos, um grupo de cromoalcaloides, derivados do metabolismo secundário da tirosina, apresentam um poder corante muito superior ao dos seus análogos disponíveis no mercado, as antocianinas. Este trabalho teve como principal objetivo a obtenção de um extrato rico em betacianinas a partir das partes pigmentadas de *G. globosa*. Para isso recorreu-se a uma MSR, de forma a reduzir o número de ensaios experimentais sem comprometer a robustez dos resultados. A MSR foi aplicada a três técnicas de extração: EAC, EAM e EAU. A melhor técnica de extração foi selecionada de forma a estudar o potencial antimicrobiana dos extratos e aplicada uma MSR de forma a obter um extrato rico em betacianinas com elevada atividade antimicrobiana. Este foi incorporado em gelados que foram, posteriormente, analisados ao longo do tempo de prateleira, quanto à cor e ao valor nutricional.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras

As amostras de *Gomphrena globosa* L. foram adquiridas na Ervital, uma empresa Portuguesa de Castro Daire (Portugal). Estas, após recessão e confirmação botânica, foram submetidas a diferentes processos mecânicos de separação de forma a obter apenas a parte pigmentada da planta.

2.2 Otimização do processo de extração utilizando MSR

Para a otimização do processo de extração compararam-se três técnicas, EAC, EAM e EAU e utilizaram-se modelos matemáticos, como a MSR para obter o ponto ótimo. Para isso, estudaram-se os efeitos das variáveis t , T ou P , $\%Et$ e S/L . Assim, para cada uma das extrações foram realizados 32 ensaios experimentais como previamente descrito pelos autores [1, 2].

2.3 Identificação e quantificação de betacianidinas

A análise dos 32 pontos descritos pelo modelo de MSR, para todas as metodologias de extração, foi efetuada por HPLC-DAD-MS/ESI. As betacianinas foram caracterizadas de acordo com o seu espectro UV-Vis e seu padrão de fragmentação. Para a análise quantitativa, utilizou-se uma reta de calibração de gonfrenina [1].

2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a melhor metodologia de extração (EAU), foi aplicada uma vez mais uma MSR, com o intuito de obter um extrato rico em betacianinas com elevadas propriedades antimicrobianas. As diferentes condições definidas pelo modelo de MSR foram as mesmas mencionadas anteriormente. Para a avaliação da atividade antimicrobiana os 32 pontos foram testados, contra um painel de microrganismos Gram-negativo, Gram-positivo e fungos, utilizando um método de microdiluição em placa aplicando um ensaio colorimétrico com cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT). As respostas foram avaliadas em termos das concentrações de extrato necessárias para obter os melhores valores de MIC e MBC/MFC [5].

2.5 Incorporação do extrato em gelados

O extrato rico em betacianinas e com elevada capacidade antimicrobiana, foi incorporado num gelado. Para a preparação do mesmo seguiu-se uma receita básica, contendo apenas açúcar, leite e natas. Nessa mistura, foi posteriormente adicionado o extrato obtido nas condições otimizadas e avaliada a sua composição nutricional e parâmetros de cor durante um período de armazenamento de 60 dias [3].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi aplicada uma MSR a diferentes técnicas de extração, tendo-se estudado os efeitos de diferentes variáveis. Como respostas foram utilizados o rendimento de extração e a concentração total de betacianinas determinada por HPLC-DAD-ESI/MS, tendo sido identificados como compostos maioritários a gonfrenina II e III e a isogonfrenina II e III. A técnica que apresentou melhores resultados foi a EAU: $t = 22$ min, $P = 500$ W; $\%Et = 0\%$, e $S/L = 5$ g/L, conduzindo a um valor de betacianinas totais de $46,9 \pm 4,8$ mg/g. A esta técnica foi aplicada novamente a MSR no sentido de obter um extrato rico em betacianinas com elevada atividade antimicrobiana. As respostas foram avaliadas em termos das concentrações de extrato necessárias para obter os melhores valores de MIC e MBC. Os resultados indicaram as seguintes condições ótimas: $t = 10,8$ min, $P = 410,5$ W; $\%Et = 57,8\%$, e razão $S/L = 5$ g/L, fornecendo as seguintes respostas de MIC $\sim 0,15$ a $0,35$ g/L e MBC $\sim 0,30$ a $0,65$ g/L.

Este extrato rico em betacianinas e com elevada atividade antimicrobiana, foi incorporado num gelado (Figura 1), tendo-se verificado ao longo do tempo de prateleira (60 dias) a coloração desejada e sem alteração do seu perfil nutricional.



Figura 1. Gelado incorporado com o extrato rico em betacianinas obtido a partir de *G. globosa*.

4. CONCLUSÃO

A metodologia de EAU foi a técnica de extração mais eficiente, conduzindo a uma maior concentração dos pigmentos em menor tempo e com menos gastos energéticos. É importante destacar que as betacianinas identificadas nesta matriz, são mais estáveis que outros pigmentos devido à presença de grupos acilo. Estas características são de grande interesse para a indústria alimentar, pois possuem ainda um poder corante três vezes superior às antocianinas, e devido às suas bioatividades diversificadas são capazes de funcionalizar alimentos para além de lhes conferir cor. Neste contexto, o extrato rico em betacianinas e com elevada atividade antimicrobiana, foi incorporado num gelado, tendo-se verificado ao longo do tempo de prateleira (60 dias) a coloração desejada e sem alteração do seu perfil nutricional. Assim, as betacianinas presentes nas flores de *Gomphrena globosa* L. podem ser utilizadas como corantes naturais.

Agradecimentos

FCT e FEDER sob o Programa PT2020 pelo apoio financeiro ao CIMO (UID/AGR/00690/2013); bolsa de C.L. Roriz (SFRH/BD/117995/2016) e contrato de L. Barros; Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Regional Norte 2020, no âmbito do Projeto NORTE-01-0145-FEDER-023289: DeCodE e do Projeto Mobilizador Norte-01-0247-FEDER-024479: ValorNatural®.

Referências

- [1] C. L. Roriz, L. Barros, M. A. Prieto, M. F. Barreiro, P. Morales, and I. C. F. R. Ferreira, *Ind. Crop. Prod.*, vol. 105, no. May, pp. 29–40, 2017.
- [2] C. L. Roriz, L. Barros, M. A. Prieto, P. Morales, and I. C. F. R. Ferreira, *Food Chem.*, vol. 229, pp. 223–234, 2017.
- [3] C. L. Roriz, J. C. M. Barreira, P. Morales, L. Barros, and I. C. F. R. Ferreira, *Lwt*, vol. 92, no. February, pp. 101–107, 2018.
- [4] N. Martins, C. L. Roriz, P. Morales, L. Barros, and I. C. F. R. Ferreira, *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 52, pp. 1–15, Apr. 2016.
- [5] S. Petropoulos, Â. Fernandes, L. Barros, A. Ciric, M. Sokovic, and I. C. F. R. Ferreira, *Food Chem.*, vol. 245, no. October 2017, pp. 7–12, 2018.

A multi-spectroscopic and thermodynamic study on the interaction of food polyphenols with gluten reactive peptides: from chemistry to health implications

*Ricardo Dias, Susana Soares, Rosa Pérez-Gregório, Nuno Mateus, Victor de Freitas**

QUINOA-LAQV/REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, Portugal

* vfreitas@fc.up.pt

Palavras chave: Celiac Disease, Peptide-Polyphenol interactions, Bioavailability

RESUMO

Celiac Disease (CD) is now seen as a worldwide epidemic disorder, lacking successful therapeutic alternatives to a gluten-free diet that has proven to be challenging both psychologically and socially. This study aims to increase the knowledge concerning the applicability and functionality of dietary polyphenols in a CD nutritional context through dissemination of the molecular and cellular mechanisms that underlie their pharmacological and disease-prevention properties. Herein, the interaction between some common food flavanols and oligomeric procyanidins towards the most bioactive CD peptide has been thoroughly characterized by means of different spectroscopic techniques thus providing valuable insights on the binding affinity and specificity as well as the binding epitopes on both 32-mer peptide and polyphenol molecules. By acquiring a deeper knowledge of these binding processes and interaction mechanisms at near physiological conditions, this study allowed to understand these events at the molecular level and the possibility to selectively modulate these interactions through nutrition to trigger a beneficial biological response on CD patients. Additionally, transepithelial transport studies with Caco-2 cells provided encouraging evidences for a potential, yet unexplored, modulatory effect of these polyphenols on the 32-mer translocation in vivo. As a multidisciplinary study, this work is transversal to most of chemical science areas with important implications in a CD biological and health context.

1. INTRODUCTION

CD is a chronic hypersensitivity disorder triggered by dietary exposure to gluten-containing foods in genetically predisposed individuals [1]. Over the past decades, CD has emerged as a major public health problem and an adherence to a strict gluten-free diet remains the only available treatment for CD patients [2]. In many cases, however, CD patients experience persistent or recurrent symptoms despite their best efforts to avoid dietary gluten and may develop uncommon but severe gastrointestinal complications [3]. Therefore, new solutions are needed to improve the quality of life of CD patients. In that sense, there is a growing body of evidence indicating that dietary polyphenols are health promoting phytochemicals with the potential to modulate predisposition to intestinal chronic inflammatory conditions [4]. Apart from their intrinsic activities as either antioxidant or anti-inflammatory agents, in a CD

perspective, food tannins stand out because of their ability to interact with proline-rich gluten reactive peptides, effectively preventing them from becoming bioavailable at the intestinal level [5].

The aim of this study is to provide molecular and thermodynamic level insights into the interaction between the most bioactive gluten peptide, the 32-mer, and some common flavonols at near physiological conditions by means of both NMR and fluorescence quenching experiments. The biological implications of such polyphenols on a CD framework was additionally explored by using the human intestinal Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier on transepithelial transwell assays.

2. MATERIAL AND METHODS

The 32-mer peptide (QLQPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF) was purchased from Synpeptide Co., Ltd. (Beicai Pudong New Area, Shanghai, China). Epigallocatechin (EGC) and epigallocatechin gallate (EGCG) were purchased from Biopurify Phytochemicals Ltd. (Chengdu, Sichuan, China). Catechin (CAT) was purchased from Sigma-Aldrich. Procyanidin dimer B3 and procyanidin trimer C2 were obtained by hemisynthesis using (+)-taxifolin and (+)-catechin as previously described [6].

Homonuclear 1D and two-dimensional (2D) ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) experiments were recorded with standard Bruker pulse sequences at 300 K and 310 K, pH 7.4.

Fluorescence quenching experiments were performed in PBS at 310 K. The excitation wavelength was fixed at 275 nm while the emission spectra were recorded from 290 to 400 nm.

The transepithelial transport of the 32-mer peptide across differentiated Caco-2 cells was evaluated by adding it either alone or together with representative food polyphenols to the apical compartment of the cell monolayers grown on 12-well transwell inserts. The chambers were incubated at 37°C for 4 hours after which basolateral aliquots were taken for peptide quantification by Nano LC-MS.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Overall, it is proposed that the primarily polyphenol-binding sites on the 32-mer peptide correspond to leucine, tyrosine and phenylalanine containing domains being this interaction entropy-driven through a thermodynamically-favored hydrophobic effect. The dissociation constant of EGCG, procyanidin dimer B3 and trimer C2 was determined using the ligand-induced chemical shift changes on the 32-mer peptide by employing a fitting model of ligand binding to multiple sites all with the same affinity. Accordingly, procyanidin trimer C2 and EGCG had a similar dissociation constant (5.4 μM and 5.5 μM , respectively) and therefore similar affinities at 300K and pH 7.4. As expected, procyanidin B3 had the highest K_D and lower affinity as a result of a lower number of aromatic surfaces and hydroxyl functional groups available for non-covalent interactions. Additionally, contrary to trimer C2 that preferentially

adopt an extended conformation, that is, a conformation in which some phenol rings are free of intramolecular stacking, procyanidin B3 adopts mainly a “compact” conformation meaning that the two phenol rings are already involved in intramolecular π - π stacking. For EGCG, its interaction mechanism is clearly different from that of dimer B3 and trimer C2 given their different abilities to aggregate and precipitate the 32-mer peptide. In that sense, the substitution pattern of EGCG ring B and the gallate group attached to the C3 appears to be critical for its distinguished kinetics and thermodynamic binding profile. Characterization of polyphenol binding to the 32-mer peptide by STD and NOESY NMR experiments highlighted the involvement of both catechol moieties of procyanidin B3 as well as the phloroglucinol ring in addition to the second catechol moiety of procyanidin C2 on peptide binding. With respect to EGCG, the two galloyl groups should be the ones more directly involved in binding and closer to the peptide units.

While EGCG appeared to be the most reactive polyphenol, procyanidin B3 and trimer C2 had a similar low-affinity constant at 310K. Nevertheless, both procyanidins were able to reduce the 32-mer peptide apical-to-basolateral translocation in *in vitro* simulated intestinal epithelial barrier thus prospecting the occurrence of additional and still unexplored regulatory mechanisms by which dietary polyphenols might modulate the transepithelial transport of CD bioactive peptides.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author thanks the Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) for funding this PhD Fellowship (SFRH/BD/112126/2015) and funds co-financed by FEDER, under the Partnership Agreement PT2020 (UID/QUI/50006/2013 - POCI/01/0145/FERDER/007265) and FEDER-Interreg España-Portugal Programme (Project ref. 0377_IBERPHENOL_6_E). NFB would like to thank the FCT for her IF grant (IF/01355/2014).

REFERENCES

- [1] Leonard, M. M.; Sapone, A.; Catassi, C.; Fasano, A. *JAMA* **2017**, 318, 647.
- [2] Ciacci, C.; Zingone, F. *Diseases* **2015**, 3, 102.
- [3] Lebwohl, B.; Sanders, D. S.; Green, P. H. R. *The Lancet* **2018**, 391, 70.
- [4] Zhang, H.; Tsao, R. *Current Opinion in Food Science* **2016**, 8, 33.
- [5] Dias, R.; Brás, N. F.; Fernandes, I.; Pérez-Gregorio, M.; Mateus, N.; Freitas, V. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, 112, 1029.
- [6] Dias, R.; Perez-Gregorio, M. R.; Mateus, N.; De Freitas, V. *Food Chemistry* **2016**, 194, 1304-1312.

Interação de uma mistura de procianidinas com saliva humana de diferentes indivíduos

Carlos Guerreiro^{1,}, Elsa Brandão¹, Nuno Mateus¹, Victor de Freitas¹, Susana Soares¹*

¹REQUIMTE/LAQV, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, 689, Porto, Portugal

[*carloseloyguerreiro02@gmail.com](mailto:carloseloyguerreiro02@gmail.com)

Palavras chave: Saliva; Proteínas Salivares; Procianidinas; Interações

RESUMO

As procianidinas são um grupo de polifenóis que estão associados com a sensação de adstringência e prontamente interagem precipitando proteínas salivares. Como a maior parte dos estudos nesta área recorrem a interações com apenas um tipo de proteínas salivares ou procinidinas, o principal objetivo deste estudo foi apurar os efeitos de uma mistura de procianidinas (maioritariamente diméricas) na precipitação das principais classes de proteínas salivares associadas à adstringência. Este modelo conseguirá então transmitir uma representação mais realista do que acontece na cavidade oral durante a ingestão de alimentos ricos neste tipo de compostos. De um modo geral, os testes realizados mostraram uma maior precipitação para a epigallocatequina, os dímeros B6 e B2-galhato e um trímero (cerca 50 %), juntamente com uma depleção total de estaterina e péptido P-B. Paralelamente, foi realizado um estudo onde se procurou aferir as mudanças a nível da produção de proteínas salivares ao longo de um ano, visto que as concentrações destas proteínas na cavidade oral são influenciadas pelos ritmos circadianos. Neste estudo verificou-se uma maior produção de PS nos meses referentes à primavera e uma tendência contrária nos meses referentes ao verão.

1. INTRODUÇÃO

Os polifenóis estão inseridos na dieta humana devido ao alargado consumo de alimentos de origem vegetal. Estes compostos e mais concretamente, as procianidinas, têm variados benefícios para a saúde nomeadamente, atividade anti-cancerígena, anti-oxidante e proteção cardiovascular e neurodegenerativa [1]. Além destas propriedades, estes compostos desempenham um papel importante nas propriedades organolépticas dos alimentos, nomeadamente no sabor e cor.

Apesar da evolução das técnicas com o passar dos anos, a análise de polifenóis em alimentos é bastante complexa e apresenta bastantes desafios. Estes desafios mais relevantes são a extração de todos os compostos, identificação de complexos moleculares e dificuldades em isolar e identificar moléculas com elevado grau de polimerização [2]. Por este mesmo motivo, toda a informação referente à quantificação de polifenóis em alimentos é maioritariamente focada em monómeros até o máximo de dodecâmeros. Os monómeros, dímeros e trímeros constituem cerca de 7 %, 11% e 8 % do conteúdo total de procianidinas em alimentos comuns, como fruta, chocolate, nozes e canela [3]. Porém, em quantidades elevadas, as procianidinas

podem provocar a sensação de adstringência e amargor, podendo reduzir a sua ingestão e assim comprometer os seus benefícios para a saúde [4].

Várias procianidinas estão identificadas como indutoras da sensação de adstringência, nomeadamente os monómeros de catequina e epicatequina, os dímeros B1 a B6 e inclusivamente foi mostrado em alguns estudos a capacidade destes compostos para interagir e precipitar proteínas salivares (PS) [5]. O principal mecanismo para a percepção da adstringência assenta na interação destes compostos com as PS da cavidade oral, levando à formação e/ou precipitação de complexos (in)solúveis [6]. As PS são normalmente divididas em 5 famílias maioritárias: proteínas ricas em prolina (PRPs), péptido P-B, estaterina, cistatinas e histatinas que juntas constituem cerca de 50 % da totalidade das PS [7]. Ainda, as PRPs são constituídas por cerca de 25 a 45 % de resíduos de prolina e estão subdivididas em classes: ácidas (aPRPs), básicas (bPRPs) e glicosiladas (gPRPs) (Messana 2008). Ao longo dos anos, tem-se consolidado o facto de as PRPs serem as principais PS relacionadas com a percepção de adstringência, primeiramente as bPRPs [8] e mais recentemente as aPRPs [5].

A maior parte dos estudos focados na interação de procianidinas com PS recorre a apenas uma das classes de PS ou um tipo de procianidina. Isto não é representativo do que ocorre na cavidade oral durante a ingestão de um alimento, onde nos deparamos com uma mistura de várias PS e procianidinas. Por este motivo este estudo procura esclarecer este tipo de interações onde estão simultaneamente presentes as principais PS e várias procianidinas associados à adstringência, recorrendo à análise por HPLC.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 Isolamento da mistura de procianidinas

A mistura de procianidinas foi isolada a partir de um extrato de grainhas de uvas tintas *Vitis vinífera*, de acordo com Soares et al. [5] e García-Estévez et al. [8]. Este extrato foi fraccionado em coluna de gel TSK Toyopearl HW-40(s) (100 mm × 10 mm.i.d., eluente metanol 0,8 mL.min⁻¹), dando origem a 5 frações. A mistura final foi isolada e purificada a partir das frações IV e V por HPLC preparativo.

2.3 Recolha de saliva

A saliva de 17 voluntários (saudáveis e não-fumadores) foi recolhida e tratada de acordo com Soares *et al.* [5]. Em resumo, a hora de recolha foi às 14h de forma a minimizar a variabilidade devido aos ritmos circadianos. A saliva de cada voluntário foi misturada com 10 % de TFA (concentração final 0.1 %), levando à precipitação de várias proteínas salivares de alto peso molecular (como mucinas, anidrases carbónicas, α -amilases e lactoferrina) e para inibir parcialmente a atividade proteolítica intrínseca. Após centrifugação (10500 RPM durante 5 min), o sobrenadante (saliva ácida, SA) foi recuperado e utilizado para as experiências seguintes.

2.4 Interação SA-procianidinas

A amostra de SA foi analisada por HPLC antes e depois da interação com uma mistura de procianidinas maioritariamente diméricas. A condição controlo foi uma mistura de SA (115 μL) com água destilada (15 μL) (volume final, 130 μL). Volumes diferentes de uma solução stock de procinidinas diméricas (22 g.L^{-1}) preparada em água destilada foram adicionados à SA (115 μL) de forma a obter as concentrações finais desejadas de procianidinas, 0,3, 0,8 ou 1,3 g.L^{-1} . O volume final foi ajustado para 130 μL com água destilada. As misturas foram agitadas, deixadas a repousar à temperatura ambiente ($\pm 20\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 10 min e posteriormente centrifugadas (10500 RPM, 5 min). Os sobrenadantes foram injetados no HPLC.

2.5 Análise em HPLC

O método utilizado na análise de HPLC da saliva foi adaptado do método descrito por Soares [5]. 60 μL de cada sobrenadante foi injetado num sistema HPLC: coluna Telos C8 (150 x 2,1 mm i.d., 5 μm) (Kynesis); deteção a 214 nm; eluentes 0,2 % TFA (A) e 0,2 % TFA em ACN/água (80/20; v/v) (B); gradiente linear de 11 % a 45 % (eluente B) durante 50 min; fluxo de 0,5 mL.min^{-1} . Após o programa, a coluna foi lavada com 100 % do eluente B e estabilizada com as condições iniciais.

O método utilizado na análise de HPLC das procianidinas foi adaptado de García-Estévez [8]. 40 μL de cada sobrenadante foi injetado num sistema HPLC: coluna Poroshell 120 EC-C18 (250 x 4,6 mm i.d., 2,7 μm) (Agilent); deteção a 280 nm; eluentes 0,1% ácido fórmico em água (A) e 0,1% ácido fórmico em ACN; gradiente 100-90% A em 3 min, 90-85,5% A em 34 min, 85,5-80% A em 3 min, 80-65% A em 15 min, 65-40% A em 5 min, e 40% A em 3 min, fluxo de 0,5 mL.min^{-1} .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi realizado um estudo de interação por HPLC de uma mistura de procianidinas (0,8 e 1,3 g.L^{-1}) com saliva de cinco indivíduos. Observou-se que, na concentração de 1,3 g.L^{-1} , os dímeros B6 e B2-galhato, um trimero e a epigalocatequina, atingiram uma precipitação máxima de 50 %. O dímero B7 apresentou maior interação a 0,8 g.L^{-1} levando a uma precipitação de 31 %. Relativamente às famílias de PS, observou-se uma precipitação de diferentes famílias de PS, diretamente proporcional à concentração de procianidinas. Foi observada uma depleção quase total de estaterina e péptido P-B em todos os indivíduos (Figura 1). Dentro das proteínas ricas em prolina (PRPs), as ácidas parecem ser as mais afetadas com o aumento gradual da concentração de procianidinas, levando a precipitações até 80 %. As cistatinas, não sofreram qualquer diminuição, exceto no indivíduo com maior teor nesta família de PS, que sofreu uma precipitação até 24%.

No entanto, é importante evidenciar que apesar de haver tendências globais, verificou-se uma variabilidade inter-individual, sendo a percentagem de precipitação das diferentes famílias de PS diferente para os diversos indivíduos.

Adicionalmente, neste estudo foram analisadas por HPLC as variações dos perfis das PS mais relevantes para a perceção da adstringência de dezassete indivíduos ao longo de um ano. Foi observado um aumento no teor total de proteínas entre os meses de março e maio (Primavera). Por oposição, foi observada uma diminuição deste teor entre os meses de junho e agosto (Verão). Esta tendência foi observada também individualmente para as famílias de PRPs

básicas e glicosiladas de todos os indivíduos. Relativamente às três classes de PRPs, as acídicas são as que apresentam menor variabilidade anual comparativamente ao teor total de PS.

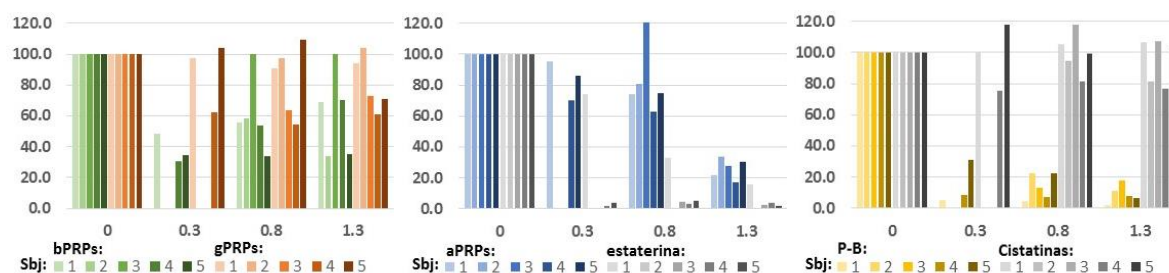


Figura 1. Variação da percentagem das famílias de proteínas salivares dos diferentes indivíduos (Sbj) após a interação com diferentes concentrações de uma mistura de procianidinas. bPRPs: proteínas ricas em prolina básicas, gPRPs: proteínas ricas em prolina glicosiladas, aPRPs: proteínas ricas em prolina acídicas.

4. CONCLUSÕES

As interações procianidinas-PS revelaram que de facto uma mistura complexa de compostos e proteínas pode-se refletir num comportamento diferente comparativamente quando se utilizam compostos ou proteínas puras. Neste caso foi notório que, não só a classes de proteínas mais afectadas foram as aPRPs, o que já era esperado segundo a literatura, mas também a estaterina e péptido P-B que sofreram uma depleção total. A produção das várias PS mostrou também ser sensível às diferentes estações do ano apresentando valores mais elevados durante a primavera.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à FCT (SFRH/BPD/88866/2012, SFRH/BD/105295/2014 e PTDC/AGR-TEC/6547/2014), à unidade de investigação LAQV (UID/QUI/50006/2013-POCI/01/0145/FEDER/007265) e ao programa FEDER-Interreg Espanha-Portugal Programme (0377_IBERPHENOL_6_E) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- [1] S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, and L. Pouységu, *Angewandte Chemie - International Edition.*, 2011, 50(3), 586-621.
- [2] S. Arranz, F. Saura-Calixto, S. Shaha, and P. A. Kroon, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57(16), 7298-7303.
- [3] L. Gu, M. Kelm, J. Hammerstone, G. Beecher, J. Holden, D. Haytowitz, S. Gebhardt, R. Prior, *J. Nutr.*, 2004, 134(3), 613-617.
- [4] S. Soares, E. Brandão, N. Mateus, and V. de Freitas, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2017, 57(5), 937-948.
- [5] S. Soares, R. Vitorino, H. Osório, A. Fernandes, A. Venâncio, N. Mateus, F. Amado, V. de Freitas, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59(10), 5535-5547.
- [6] E. C. Bate-Smith, "The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance.," *J. Linn. Soc., Bot.*, 1962, 58(371), 95-173.
- [7] I. Messana, R. Inzitari, C. Fanali, T. Cabras, and M. Castagnola, *Journal of Separation Science*. 2008, 31(11), 1948-1963.
- [8] Y. Lu and A. Bennick, *Arch. Oral Biol.*, 1998, 134(3), 613-617.

Incorporation of *Spirulina* and *Himanthalia elongata* algae in integral pasta: a real protein meal

Bárbara C.C. Oliveira^{a,b}, Sílvia M.F. Bessada^{a}, Susana Machado^a, Rita C. Alves^a,
M. Beatriz P.P. Oliveira^a*

^aREQUIMTE/Chemical Sciences Department, Faculty of Pharmacy, University of Porto,
Rua Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313, Porto, Portugal.

^bFaculty of Sciences, University of Porto, Rua do Campo Alegre, s/n, 4169-007 Porto, Portugal

*silviabessada@gmail.com

Keywords: *Spirulina*; *Himanthalia elongata*; Protein; Pasta; Algae

ABSTRACT

Pasta products are worldwide consumed and well-accepted by all age groups (including children) due to their sensory and nutritive values, low cost and easy preparation. In recent years, different healthy ingredients as algae, have been used in pasta production to enhance its nutritional and/or functional properties. *Spirulina* is a filamentous blue-green microalga, well known as a good source of protein (50-70 g/100 g) [1]. Attending to FAO/WHO recommendations, for healthy adults the protein requirements is around 0.66 g/kg/day, so new sources of dietary protein as algae are needed not only to feed the world's population but also to reduce the negative environmental impact of animal protein production. In the present study, the nutritional composition of an integral pasta with algae (whole durum wheat and sea spaghetti 2% and *Spirulina* 1.5%) was evaluated and the results (n=3) compared with the same pasta without added algae. Both samples were analysed before and after cooking to understand the changes in the nutritional value resulting from the food processing. The same experiments were performed in dried *Spirulina* and *Himanthalia elongata* samples. The results showed an increase in the protein content (~12-13 %) with the addition of algae, remaining unchanged with cooking process.

1. INTRODUCTION

Pasta is a common foodstuff of human diet due to their nutritive value, sensory attributes, low cost and short time preparation. Traditionally manufactured with flour of bleached, semi-whole or whole durum wheat, pasta is a good dietary source of energy due to its carbohydrate content. Due to the growing demand for functional products, pasta producers and food industry have been fortified their products with new ingredients that can provide health benefits (e.g. high-protein sources and antioxidants, anti-inflammatory, anti-hypertensive effects...) [2]. Proteins are macronutrients that play an essential role as structural and functional components of living systems. The quality of dietary protein results from the presence of essential amino acids, those that human organism cannot synthesize and are only supplied by food. The dietary requirements of protein and amino acids, particularly those considered as essential to normal human

metabolism, depends on several factors such as developmental stage, physiological status, microbiota in the intestinal lumen, environmental factors, and pathological state. Attending to FAO/WHO recommendations, protein requirements for healthy adults are around 0.66 g/kg/day. Usually, the protein intake is provided by foods of animal origin, being considered as the high quality protein. However, environmental impact issues as well as new consumer trends in choosing non-animal protein (vegetarians and vegans) need to be taken into account. Due to this, new sources of dietary protein, as algae, are needed not only as a way to feed the world's population but also to reduce the negative environmental impact of animal protein production. *Spirulina* is a filamentous blue-green microalga, well known as a good source of protein (50-70 g/100 g) [1, 2] and also containing bioactive compounds that can supplement the human diet. Microalgae cultivation provides a source of edible protein, cheaper and easier and with a lower impact on the environment. Due to the chemical composition of *Himanthalia elongata* (sea spaghetti), this brown seaweed could be a new source of functional ingredients [3]. Sea spaghetti have a high fibre content, as well as antioxidant and antimicrobial activities [2, 3]. Recently, many studies report the incorporation of *Spirulina* and different seaweed on pasta to enhance their nutritional content and also improve benefits on human health [1, 4, 5]. In the present study, the nutritional composition of an integral pasta with algae (whole durum wheat and sea spaghetti 2% and *Spirulina* 1.5%) was evaluated and compared with the same pasta without algae. Particular attention was given to the protein content of the foodstuff fortified with algae.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Samples and samples preparation

Samples of whole durum wheat pasta containing *Himanthalia elongata* 2% and *Spirulina* 1.5% were kindly supplied by Algamar (Pontevedra, Spain). Each package contains 250 g of integral pasta and the expiration date is 09/2019. Two packages were used. One of the packages was cooked as the following procedure: 250 g of pasta were cooked for 15 minutes in 700 mL of boiling water with 5 g salt. After being drained, the pasta was triturated for 5 seconds at 10.0 rpm (Grindomix GM 200, Retsch) and then lyophilized (Cryodos, Telstar) after being frozen at -80 °C to remove almost all water absorbed. The other pasta package was analysed as raw. Two packages of integral pasta without added algae were used as control and following the same procedure as previously described. Samples of individual dried *Spirulina* and *Himanthalia elongata* were also evaluated.

2.2 Nutritional analysis

Total lipids and total protein were determined by the Soxhlet and the Kjeldahl methods, respectively. Ashes were quantified after incineration at 500 °C [6]. Moisture was determined using an infrared balance (Scaltec model SMO01, Scaltec Instruments, Heiligenstadt,

Germany). Total carbohydrate content was determined by difference. For protein determination by Kjeldahl method, the conversion factor used were 5.83 for the pasta samples (with and without algae added) and 5.0 for dried *Spirulina* and sea spaghetti. All the samples were analysed in triplicate.

3. RESULTS AND DISCUSSION

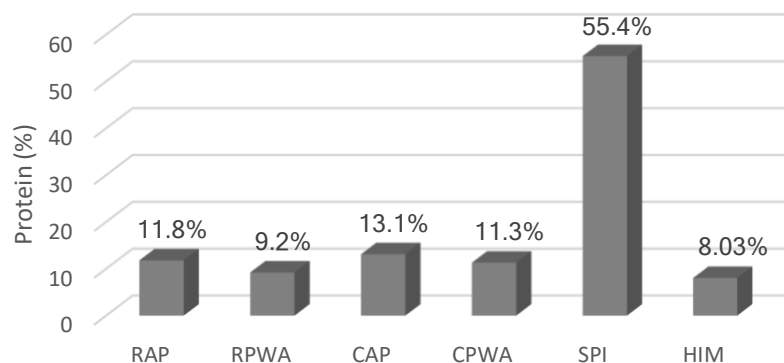
The nutritional composition of two different types of pasta (before and after cooking) under analysis are presented in **Table 1**. As expected, all samples analysed in this study were very rich in total carbohydrates (including fibre) being pasta a good source of energy. Attending total lipid and ash content both pasta types showed lower values, however integral pasta with algae have higher content of ash than pasta without algae added, due to the high content of minerals in algae. After carbohydrates, pasta provides a high level of protein. The samples under study present values of 12% of protein when pasta was fortified with algae comparatively to 9% of pasta without algae added. When cooked by the traditional method, the percentage of protein found was 13% for pasta with algae and 11% for cooked pasta without algae. The results showed that when ingredients as algae (1.5% of *Spirulina* and 2% of sea spaghetti) are added to the pasta leads to an increase in protein content, possibly due to the percentage of *Spirulina* added once this microalgae is a good source of protein, as shown in **Figure 1**.

Table 1. Nutritional composition of two types of pasta (in raw and cooked/freeze dried status).

| Nutritional composition (%) | | | | | |
|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------------|
| | Moisture | Ash | Fat | Protein | Total carbohydrate |
| RAP | 9.74 ± 0.40 | 1.94 ± 0.01 | 0.42 ± 0.02 | 11.8 ± 0.32 | 76.1 |
| RPWA | 8.73 ± 0.17 | 1.58 ± 0.09 | 0.25 ± 0.00 | 9.2 ± 0.34 | 80.2 |
| CAP | 3.33 ± 0.03 | 2.29 ± 0.04 | 0.35 ± 0.00 | 13.1 ± 0.39 | 81.0 |
| CPWA | 4.39 ± 0.31 | 2.10 ± 0.02 | 0.53 ± 0.02 | 11.3 ± 0.54 | 81.7 |

Raw algae pasta (RAP); raw pasta without algae (RPWA), cooked algae pasta (CAP), cooked pasta without algae (CPWA).

The protein content of each sample under study are shown in **Figure 1**. For nutritional analysis, cooked pasta was freeze-dried after drained. The moisture content of cooked and drained pasta was 57% (pasta with algae) and 59% (pasta without algae added) (data not showed).



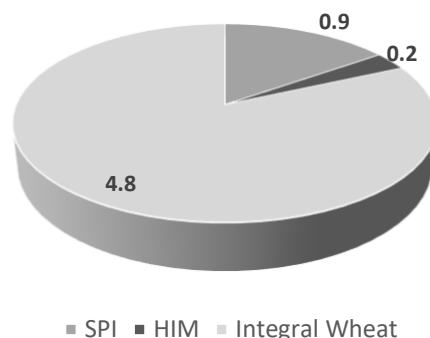


Figure 2. Protein (g) contribution of ingredients in 100 g of cooked and drained pasta (ready-to-eat).

The contribution of each pasta ingredients for total protein content of pasta with algae, cooked and drained and suitable for consumption are shown at **Figure 2**. 2% of *Himanthalia elongata* and 1.5% of *Spirulina* contribute around 0.2 g and 0.9 g respectively for the protein content of ready-to-eat 100 g of pasta.

4. CONCLUSION

The results show a protein content increase of pasta when functional ingredients are added such algae. *Spirulina* is a potential source of protein and their incorporation in foods, as pasta, can leads into functional foods. Attending to the high protein content of pasta fortified with algae (*Spirulina* and *Himanthalia elongata*) future work will be performed on evaluating the protein quality by amino acids profile.

Acknowledgements

To ALGAS ATLÂNTICAS ALGAMAR (Pontevedra, Spain) for providing the samples. The authors also thank the financial support to the project Operação NORTE-01-0145-FEDER-000011– denominada Qualidade e Segurança Alimentar- uma abordagem (nano)tecnológica. This work was also supported by the project UID/QUI/50006/2013 – POCI/01/0145/FEDER/007265 with financial support from FCT/MEC through national funds and co-financed by FEDER. Sílvia M.F. Bessada acknowledges the PhD fellowship (SFRH/BD/122754/2016) funded by FCT.

References

- [1] G Özyurt, L Uslu, I Yuvka, S Gökdoğan, G Atci, B Ak, O Işık, J Food Qual, 2015, 38, 268-272
- [2] AC Lemes, KP Takeuchi, JCM Carvalho, EDG Danesi, Braz Arch Biol Technol, 2012, 55, 741-750.
- [3] [G Rajauria, B Foley, N Abu-Ghannam, Innovative Food Sci Emerging Technol, 2016, 37, 261-268](#)
- [4] CA Oliveira, AAO Campos, SMR Ribeiro, WC Oliveira, AG Nascimento RASBRAN-Revista da Associação Brasileira de Nutrição, 2013, 1, 52-59.

- [5] M Fradique, AP Batista, MC Nunes, L Gouveia, NM Bandarra, A Raymundo, J Sci Food Agric, 2010, 90, 1656-1664
- [6] [AOAC, 2012. Official Methods of Analysis. Association of Analytical Communities, USA.](#)

Detection of γ -glutamyl-S-ethenyl cysteine in *Vicia narbonensis* L.: improvement of the extraction process

Susana Machado^{a*}, Michele F. da Cunha^a, Sílvia M.F. Bessada^a, Rita C. Alves^a, Eugénia Nunes^b, M. Beatriz P.P. Oliveira^a

^aREQUIMTE/Chemical Sciences Department, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua Jorge Viterbo Ferreira,

228, 4050-313, Porto, Portugal.

^bGreenUPorto/Faculty of Sciences, University of Porto, Rua do Campo Alegre, s/n, 4169-007 Porto, Portugal

*su_tche@hotmail.com

Keywords: Leguminous; *Vicia narbonensis* L.; antinutritional factor; γ -glutamyl-S-ethenylcysteine (GEC)

ABSTRACT

Vicia narbonensis L. commonly known as *narbon* vetch, is a low input crop, capable of high yield production under harsh environmental conditions, namely drought. The high protein content of seeds makes it an interesting alternative for food and feed. However, the presence of an antinutritional factor - the dipeptide γ -glutamyl-S-ethenylcysteine (GEC) - in the seeds, can limit the nutritional use of this crop [1,2].

Several extraction conditions were tested for GEC recovery using ethanol/water (70:30 v/v) as extraction solvent, according to Arias *et al.* [3]. A GEC recovery of around 90% was achieved with 0.25 g of sample and 1h of extraction, which represents environmental and economic advantages.

1. INTRODUCTION

The world population is expected to reach 10 billion by 2050, leading to an increase of 50% in agricultural requirements compared to 2013. Both global growing population and climate changes, will further pressure food supply systems, creating the need for alternative and resilient sources of food. The implementation of sustainable agriculture techniques aims long-term maintenance of natural and agricultural resources, minimum adverse impacts on environment, and low use of chemical inputs to attain human needs [4]. Legumes, cultivated since ancient times, constitute a staple food due to their high nutritional value, long-term storage and shelf life, as well as their role in sustainable agricultural systems. In fact, legumes stand out as contributors to sustainability of the agroecosystem as a source of nitrogen supply for soils [5]. Besides to the low environmental impact of production and their adaptation to marginal abiotic conditions, legumes are an important crop by providing dietary protein, carbohydrates, fiber, minerals and vitamins. Major legumes crops include peas, beans, chickpea, and pigeon pea, are used to feed the world, however, minor legume species defined as resilient crops to climate changes, can represent important alternative food sources in marginal environments [6]. *Vicia narbonensis* L., commonly known as *narbon* vetch (Faveta-de-Beja) is a low input crop, however, with a high yield production even under harsh environmental conditions as drought.

This crop does not require the use of fertilizers and pesticides for intensive production. In addition, the erect growing habit is suitable to mechanical harvesting [7]. The high protein content (28% in seeds, 9% in straw) of *Vicia narbonensis* L. makes this crop an interesting alternative for human and animal feeding. [1;8]. However, the presence of antinutritional factors (ANFs), more specifically, an antinutritional dipeptide (γ -glutamyl-S-ethenyl-cysteine, GEC) can limit the use of *narbon* vetch as food [2;9;10]. Among all legume crops, the presence of antinutrients, anti-physiological or toxic compounds can diminish the protein digestibility and mineral bioavailability and may cause deleterious effects on human health. The content of GEC in *V. narbonensis* L. seeds, around 10-30 g/kg, makes it unpalatable for animals, due to their unpleasant taste. As a major ANFs in legumes, GEC, a storage compound important to seed physiology, and as a defense mechanism against herbivory attack [9]. While some ANFs can be deactivated in the rumen of ruminants, the same does not occur in monogastric animals, as cases of nephritis and erythrocyte damage in pigs and tubular nephrosis in broiler chickens have been reported due to GEC ingestion [2]. However, a study performed by Eason et al., 1990 did not reports significant effects in a diet containing 100 g/kg of *narbon* vetch when compared to other sources of protein [11]. The controversy between reported harmful effects of GEC and others without evidence of negative effects can be attributed to genetic, animal age, and different varieties of *narbon* vetch under study [9].

It turns out to be necessary to select among minor legumes, genotypes with potential food purposes, such as varieties and/or accessions of *V. narbonensis* L., with low or null content in GEC, using a low cost and fast analytical methodology for GEC determination. Spectrophotometry [1], high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) [9], capillary electrophoresis with ultraviolet detection (CE-UV) [3], and capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry (CE-MS) are some of the methodologies reported for GEC detection and quantification in *V. narbonensis* seeds [3]. The aim of this work was to improve the extraction time and detection of GEC by reversed-phase HPLC, monitoring the dipeptide elution at 215 nm, for the selection of accessions with low/zero levels of GEC.

2. MATERIALS AND METHODS

V. narbonensis L. seeds with high levels of GEC were provided by GreenUPorto/Faculty of Sciences, University of Porto and used as positive control. For GEC extraction, seeds were firstly lyophilized (Cryodos, Telstar) and milled. Afterwards ethanol/water (70/30, v/v) was added to the extracts by stirring and centrifugation (Heraeus Megafuge 16, Thermo scientific) at 5000 rpm for 30 min. Briefly, the optimization conditions for GEC extraction were: extraction **A** (0.5 g of sample, extracted twice in 5 mL of solvent, extraction time 60 min and centrifugation time 30 min, for each one; a total procedure time of 180 min); extraction **B** (0.5 g, extracted twice in 5 mL, 30 min extraction and centrifugation time, 120 min total procedure time); extraction **C** (0.5g in 10 mL, 60 min extraction time, 30 min centrifugation time, 90 min total procedure time); extraction **D** (0.5 g in 10 mL, 30 min extraction and centrifugation time,

60 min total procedure time); extraction **E** (0.25 g in 5 mL, 60 min extraction time, 30 min centrifugation time, 90 min total procedure time); extraction **F** (0.25 g in 5 mL, 30 min extraction and centrifugation time, 60 min total procedure time). The conditions of extraction **A** corresponding to the maximum GEC content, according to R. Sánchez-Vioque, *et al* [9].

The resulting supernatant was collected and subjected to ultracentrifugation (Heraeus, Biofuge Pico) at 12 000 rpm for 5 min. The HPLC system (Jasco, Japão) consisted on a quaternary pump (PU-2089, Jasco), an automatic injector (AS-2057, Jasco) and a diode array detection (MD-2018, Jasco). Extracts (20 µl) were injected in a reverse phase column Tracer Excel ODSA, 250 mm x 4 mm, 5 µm (Teknokroma, Barcelona, Espanha). Elution was performed at 1 mL/min at room temperature in isocratic mode using trifluoroacetic acid in water (1 mL/L)/trifluoroacetic acid in acetonitrile (1 mL/L) 90/10 (v/v). Elution was monitored by UV absorption at 215nm.

3. RESULTS AND CONCLUSION

To obtain a complete GEC extraction from seed samples of *V. narbonensis* L., three variables - mass (*m*), time (*t*) and volume (*v*), were optimized to maximize GEC recovery. Based on R. Sánchez-Vioque, *et al* (2011) [9] the extraction conditions of 0.5 g of sample in 5 mL ethanol/water (70/30, v/v) during a total procedure time of 180 min represent 100% of GEC recovery (**A**). Starting with extraction **A** condition, the dipeptide GEC was eluted from the column as a unique and symmetric peak at 8.75 min, at 215 nm (Fig. 1). Since extraction **A** condition was highly time-consuming, the three variables (*m*, *t* and *v*) were tested again to reduce extraction time (Fig. 2). GEC recovery ranging from 88 to 90% was obtained in extraction **E**, **F** and **C**.

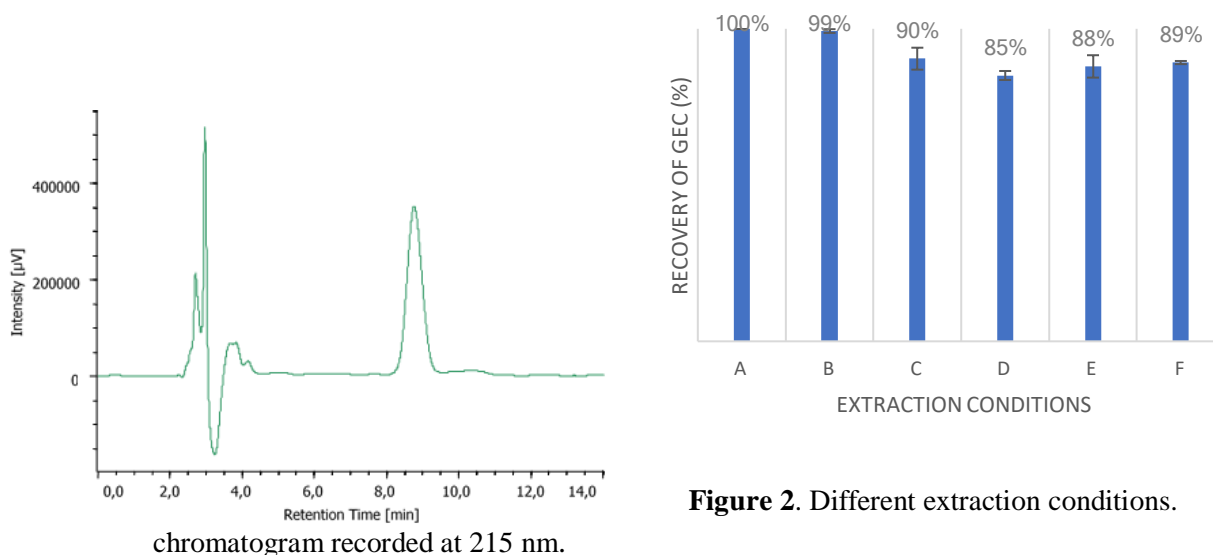


Figure 2. Different extraction conditions.

D extraction condition leads a GEC recovery of 85%. However, the **B** extraction condition recovers 99% of GEC, but after a total procedure time of 120 min.

GEC recovery of 89%, with 0.25 g of sample during 30 min of extraction time and 60 min total procedure time (**F**) was determined by reversed phase HPLC with UV detection at 215 nm.

A reduction of total procedure time to 1 h was attained with environmental and economic advantage.

Acknowledgements:

Authors thank the financial support to the project Operação NORTE-01-0145-FEDER-000011– denominada Qualidade e Segurança Alimentar- uma abordagem (nano)tecnológica. This work was also supported by the project UID/QUI/50006/2013 – POCI/01/0145/FEDER/007265 with financial support from FCT/MEC through national funds and co-financed by FEDER. Sílvia M.F. Bessada acknowledges the PhD fellowship (SFRH/BD/122754/2016) funded by FCT.

References

- [1] R Sánchez-Vioque, MF Rodríguez-Conde, J Vioque, J Girón-Calle, O Santana-Méridas, M De-los Mozos-Pascual, ME Izquierdo-Melero, M Alaiz, Anal Biochem, 2011, 418, 180-183.
- [2] D Enneking, University of Adelaide, 1994, 121-124.
- [3] M Arias, C Simó, LT Ortiz, M Mozos-Pascual, C Barbas, A Cifuentes, Electrophoresis, 2005, 26, 2351-2359.
- [4] E Ehlers, O que é agricultura sustentável, 1º edição, 2017, Editora Brasiliense: Brasil.
- [5] TJC Amado, J Mielniczuk, SBV Fernandes, R Bras Ci Solo, 2000, 24, 179-189.
- [6] TP Chibarabada, AT Modi, T Mabhaudhi, 2017, Sustainability, 2017, 9, 1-25.
- [7] https://jb.utad.pt/especie/Vicia_narbonensis. Jardim Botânico da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2018, Espécies: *Vicia narbonensis* L. Acedido a 06/09/2018.
- [8] AMA Moneim, J Agron Grop Sci, 1992, 169, 347-353.
- [9] R Sánchez-Vioque, J Girón-Calle, MF Rodriguez-Conde, J Vioque, M De-los-Mozos-Pascual, O Santana-Méridas, ME Izquierdo-Melero, M Alaiz, Anim Feed Sci Technol, 2011, 165, 125-130.
- [10] P Yu, M Sprague, AR Egan, GH Castleman, BJ Leury, Anim Feed Sci Technol, 2001, 92, 1-16.
- [11] PJ Eason, RJ Johnson, GH Castleman, Aust J Agric Res, 1990, 41, 565-71.

Avanços dos sistemas alimentares integrados com o ambiente

Produção alimentar sustentável

Alimentação do futuro

LIGNIN nanoparticles loaded with bluish pyranoanthocyanin pigments. Increased stability in aqueous systems.

Paula Araújo¹, Ana Costa^{2,3}, Iva Fernandes¹, Nuno Mateus¹, Victor de Freitas¹, Bruno Sarmiento^{2,3,4}, Joana Oliveira^{1*}

¹ ICETA/REQUIMTE – Laboratório Associado para a Química Verde, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, Portugal.

² Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3S), Universidade do Porto, Porto, Portugal

³ Instituto de Engenharia Biomédica (INEB), Universidade do Porto, Rua Alfredo Allen 208, 4200-135 Porto, Portugal.

⁴ CESPU, Instituto de Investigação e Formação Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde & Instituto Universitário de Ciências da Saúde, Rua Central de Gandra 1317, 4585-116 Gandra, Portugal.

* jsoliveira@fc.up.pt

Keywords: pyranoanthocyanin dimer (PD); portisins (P); Kraft lignin; nanoparticles; chromatic and pH stability.

ABSTRACT

The ability of Kraft lignin to be used as a polymer to produce nanoparticles encapsulated with pyranoanthocyanin dimers (PD) and portisins (P) pigments was evaluated by dialysis. The obtained nanoparticles were characterized over 28 days with dynamic light scattering (DLS) and electrophoretic light scattering (ELS), by measuring their average particle size (Z-average), polydispersity index (PDI) and average zeta potential (ξ). The lignin nanoparticles loaded with the pyranoanthocyanin dimers (PD-LNP) and portisins (P-LNP) exhibited a Z-average around 200 nm, a PDI below 0.2 and (ξ)-potential values around – 40 mV.

TEM, SEM and STEM images showed that the particles present a spherical and compact shape and that these characteristics were maintained for 28 days at room temperature. The nanoparticles stability with the pH was studied and it was observed that at $\text{pH} \geq 5$ lignin nanoparticles dispersions were stable for at least 7 days, while for the $\text{pH} \leq 4$ aggregation was observed.

1. INTRODUCTION

Recently, the research on the application of polyphenols to different food matrices to create Functional Foods have attracted many Research Groups [1,2]. However, polyphenols supplemented directly into food matrices usually lose their stability, biological properties and their bioavailability or confer them unpleasant tastes such as the astringency caused by the addition of condensed tannins to foods [3,4].

Bearing this, the development of polyphenols encapsulated systems can attenuate these effects and increase their stability towards pH, light, oxidation or enhance their solubility and bioavailability.

Kraft lignin is a by-product produced in large amounts as a result of the chemical pulping process in the pulp and paper industry [11].

Recently it has been shown the use of Kraft lignin to produce nanoparticles as a carrier of different hydrophobic molecules for the efficient delivery of drugs and bioactive compounds [12-14].

Bearing all this, the aim of this work was to use Kraft lignin nanoparticles for the encapsulation of bluish anthocyanin-derived pigments to improve their stability and solubility in aqueous systems.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Preparation of lignin nanoparticles loaded with bluish pyranoanthocyanin pigments

Nanoparticles loaded with pyranoanthocyanin dimers (PD-LNP) and portisins (P-LNP) were prepared from the mixture of Kraft lignin (2 mg/mL) with the respect pigments and dissolved in 90% (v/v) acetone. The initial concentration of pyranoanthocyanin dimers used was 0.2 mg/mL, while for the portisins was 0.4 mg/mL. Then, this mixture was introduced into a dialysis bag (flat width, 25 mm) with a 12-14 KDa cut-off (Spectra/Por® 2 Standard RC Tubing, Spectrum Labs, USA).

Membranes were left submerged in deionized water (1:60) under slow stirring during 24 hours at room temperature with the dialysis water being periodically replaced.

PD-LNP and P-LNP were prepared in triplicate.

2.2 Characterization of lignin nanoparticles

The characterization of LNP, PD-LNP and P-LNP was performed by measurement of Z-average, PDI and (ξ)-potential, using DLS and ELS. All samples were diluted 200 times with MilliQ-water and analysed in triplicate.

The morphology of all lignin nanoparticles was determined by SEM, STEM and TEM analysis. The preparation of samples for the SEM analysis was performed by deposition of a droplet of the LNPs suspension directly on a silicon substrate (5 mm x 5 mm) and coated the samples with a thin film of AuPd, alloy about 10 nm thick, to ensure the surface conductivity.

For STEM and TEM analysis, approximately 10 μ L of each sample was applied to a carbon-coated cooper grid (100 Mesh), air-dried during 1 minute and the excess of volume was removed with a filter paper. For TEM images, 10 μ L of lanthanum were added as contrast and let to dry 10 seconds.

In SEM and STEM images samples were used directly. In the case of TEM the LNPs suspensions were diluted 25 times with MilliQ-water before its preparation for analysis.

2.3 Stability of lignin nanoparticles at different pH values

The stability of LNP, PD-LNP and P-LNP at different pH values ranging from 1 to 8 was assessed with the Zetasizer Nano ZS instrument by following the changes on the Z-average, PDI and (ξ)-potential. These determinations were performed after the preparation of the

samples and after the samples being stored at each pH value during 7 days at 37°C. For each sample and pH value, three replicas were prepared. For that, 200 µg/mL of each lignin nanoparticle (LNP, PD-LNP and P-LNP) were incubated with distilled water at different pH values from 1 to 8, during 7 days at 37 °C.

3. RESULTS AND DISCUSSION

In this work it was possible to prepare lignin nanoparticles loaded with bluish pyranoanthocyanin pigments through the dialysis method.

All produced nanoparticles present a Z-average around 200 nm, PDI \approx 0.2 and ξ -potential \approx -40 mV, at the initial time and after 28 days, which indicate the stability of these compounds over this time at room temperature.

Independently of the absence or presence of the pigment, the ξ -potential (\approx -40mV) remained constant which means that didn't change significantly the charge at the surface of the nanoparticles. Moreover, the presence of this negative charge at the surface of the particles yields to a repulsion between the particles that is important for their stability.

The size and morphology of all lignin nanoparticles were also studied by TEM and the images showed symmetric and uniformly spherical shape particles with diameters around 160 nm, compatible with the values determined by the DLS analysis. These results show that the inclusion of the bluish pigments into the lignin nanoparticle didn't change the size and the morphology of the lignin nanoparticles.

Moreover, using SEM and STEM analysis it was possible to determine that the majority of the lignin nanoparticles (empty or loaded with the pigments) present a spherical and compact morphology and these characteristics were maintained for 28 days at room temperature.

The stability of LNP, PD-LNP and P-LNP at different pH values ranging from 1 to 8 was also evaluated during 7 days. For $\text{pH} \geq 5$ lignin nanoparticles dispersions were stable for at least 7 days, without a significant change ($p < 0.05$) in all parameters (size, PDI and ξ -potential) except for P-LNP with a significant increase ($p < 0.05$) in the PDI value at pH 5.

On the other hand, for $\text{pH} \leq 4$, the observed decrease of the ξ -potential below $|\pm 20 \text{ mV}|$ caused by a weak electrostatic repulsion which led to a higher proximity of particles and promoted the aggregation yielding to an increase in the average particle size after 7 days.

4. CONCLUSION

Bearing all this, it seems that this natural polymer (kraft lignin) resulting has a waste from the pulping paper process can be used as a tool to stabilize the colour of natural bluish dyes and to improve their solubility in aqueous systems.

Acknowledgements

This work received financial support from FEDER funds through COMPETE, POPH/FSE, QREN, and FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia) by two postdoctoral scholarships

(SFRH/BPD/112465/2015, SFRH/BPD/84805/ 2012), an investigator contract (IF/00225/2015), and grants PTDC/AGR-TEC/2789/2014 COMPETE POCI-01-0145- FEDER-016616, REDE/1517/RMN/2005. This work also received financial support (UID/QUI/50006/2013 - POCI/01/0145/FEDER/007265) from FCT/MEC through national funds and was cofinanced by FEDER, under the Partnership Agreement PT2020 and FEDER-Interreg España-Portugal Programme (project ref 0377_IBERPHENOL_6_E).

Referências

- [1] Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005, 45, 287-306.
- [2] Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Révész, C.; Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2004, 79, 727-747.
- [3] Fang, Z.; Bhandari, B. Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology* 2010, 21, 510-523.
- [4] Soares, S.; Sousa, A.; Mateus, N.; de Freitas, V. Effect of Condensed Tannins Addition on the Astringency of Red Wines. *Chemical Senses* 2012, 7, 191-198.
- [5] Fernandes, A.; Brás, N. F.; Mateus, N.; de Freitas, V. Understanding the molecular mechanism of anthocyanin binding to pectin. *Langmuir* 2014, 30, 8516-8527.
- [6] Munin, A.; Edwards-Lévy, F. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics* 2011, 3, 793-829.
- [7] Fernandes, A.; Ivanova, G.; Brás, N. F.; Mateus, N.; Ramos, M. J.; Rangel, M.; de Freitas, V. Structural characterization of inclusion complexes between cyanidin-3-O-glucoside and β -cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers* 2014, 102, 269-277.
- [8] da Silva, S. B.; Amorim, M.; Fonte, P.; Madureira, R.; Ferreira, D.; Pintado, M.; Sarmiento, B. Natural extracts into chitosan nanocarriers for rosmarinic acid drug delivery. *Pharmaceutical Biology* 2015, 53, 642-652.
- [9] Madureira, A. R.; Campos, D. A.; Fonte, P.; Nunes, S.; Reis, F.; Gomes, A. M.; Sarmiento, B.; Pintado, M. M. Characterization of solid lipid nanoparticles produced with carnauba wax for rosmarinic acid oral delivery. *RSC Advances* 2015, 5, 22665-22673.
- [10] Kim, S. J.; Cho, Y.-H.; Park, W.; Han, D.; Chai, C.-H.; Imm, J.-Y. Solubilization of Water Soluble Anthocyanins in Apolar Medium Using Reverse Micelle. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 7805-7809.
- [11] Gellerstedt, G. Softwood kraft lignin: Raw material for the future. *Industrial Crops and Products* 2015, 77, 845-854.
- [12] Dai, L.; Liu, R.; Hu, L.-Q.; Zou, Z.-F.; Si, C.-L. Lignin Nanoparticle as a Novel Green Carrier for the Efficient Delivery of Resveratrol. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2017, 5, 8241-8249.
- [13] Yong Qian, Y. D., * Xueqing Qiu,* Hao Li and Dongjie Yang Formation of uniform colloidal spheres from lignin, a renewable resource recovered from pulping spent liquor. *Green Chemistry* 2014, 16, 2156.
- [14] Camille, F.; Marius, R.; P., R. A.; D., V. O.; D., S. S.; N., P. V. Fabrication of Environmentally Biodegradable Lignin Nanoparticles. *ChemPhysChem* 2012, 13, 4235-4243.

Phenolic profile of different *Cichorium spinosum* L. ecotypes

Lillian Barros^{a,*}, Spyridon A. Petropoulos^b, Ângela Fernandes^a,
Isabel C.F.R. Ferreira^a

^a Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal

^b Laboratory of Vegetable Production, University of Thessaly, Magnissia, Greece

*lillian@ipb.pt

Keywords: *Cichorium spinosum*; phenolic compounds; chicoric acid.

ABSTRACT

The flora of the Mediterranean basin includes many wild edible horticultural species and most represent an important food and medicinal source for the rural communities. In the present study, the profile of phenolic compounds of various *Cichorium spinosum* L. ecotypes was evaluated. For this purpose, six ecotypes of *C. spinosum* purchased by retail supermarkets, collected *in situ*, and cultivated at the farm of the University of Thessaly were examined. Significant differences were observed among the various studied ecotypes in their phenolic compounds' content and profile, especially between wild and cultivated ecotypes. Wild ecotypes had lower content of total phenolic compounds than cultivated ones, whereas commercial products were very rich in flavonoids, especially in kaempferol-3-*O*-glucuronide, isorhamnetin-3-*O*-glucuronide and apigenin-*O*-glucuronide, in comparison to the other ecotypes (wild and cultivated). Commercial cultivation of *C. spinosum* should be encouraged since it ensures higher content of phenolic compounds. Thus, this species has a great potential since it could be used as a new alternative in the food industry.

1. INTRODUCTION

Several studies demonstrated the importance of wild edible species in the traditional Mediterranean diet as well as their pharmaceutical and medicinal properties. Leafy vegetables are an important source of phytonutrients that are essential for the human body and can be included in many vegetable salad dishes in order to enrich dietary sources of health promoting compounds [1].

Phenolic compounds are secondary metabolites that can be found in many plants and have a great importance in various physiological and morphological features, such as defense mechanisms, cell wall structure, interaction with phytohormones, proteins and enzymes, scavenging of free radicals and signaling for gene expression [2].

Cichorium spinosum L., also known as “stamnagathi” in Greek language, belongs to the Asteraceae family. It is a native plant in the Mediterranean basin and can be found in the Balearic Islands, Cyprus, Greece, Italy and Spain. It usually grows in coastal areas or plateaus of the mainland and constitutes a very common ingredient of the so-called Mediterranean diet [3].

Therefore, the aim of the present study was the identification of specific phenolic compounds of *C. spinosum* ecotypes from the eastern Mediterranean; a comparison between experimentally cultivated and/or commercial products with wild plants collected *in situ* was carried out, in order to identify the best conditions to increase polyphenols content.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Sampling material

Samples of six ecotypes of *Cichorium spinosum* L. were evaluated, namely, commercial products obtained from retail supermarkets in Greece (samples 2 and 3); wild ecotypes collected *in situ* in the area of Velanidia, Greece (samples 4 and 5); and plants grown at the farm of the University of Thessaly (samples 1 and 6).

Hydromethanolic extracts were prepared by stirring the dried plant material (1 g) with 30 mL methanol/water (80:20, v/v, at 25 °C) for 1 h and subsequently filtering. The residue was then re-extracted with an additional portion of 30 mL of the hydromethanolic mixture. The combined extracts were evaporated under reduced pressure until complete removal of methanol, and the aqueous phase was frozen and lyophilized. The extracts were redissolved in methanol/water (80:20, v/v) at a final concentration of 5 mg/mL.

2.2. Phenolic compounds' analysis

The phenolic compounds' analysis was carried out by liquid chromatography coupled to a diode array detector and an electrospray ionization multistage mass spectrometry operating in negative mode [4]. Phenolic compounds were identified by comparison of commercial standards when available or tentatively identified using reported data from literature. Calibration curves were obtained by using commercial standards and were based on the UV-Vis signal. When no commercial standard was available, a similar compound from the same phenolic group was used as a standard. Results were expressed as g per kg of dry extract.

2.3. Statistical analysis

For all the analyses, three samples were analyzed for each treatment and all of the assays were carried out in triplicate (n=9). The results were expressed as mean values and standard deviations (SD). Statistical analysis of data was applied using SPSS v. 22.0 program (IBM Corp., Armonk) through a one-way analysis of variance (ANOVA) while, for means where a statistical difference was detected, means comparisons were carried out using Tukey's HSD test ($p=0.05$).

3. RESULTS AND DISCUSSION

The phenolic compounds' profile of *C. spinosum* hydromethanolic extracts are presented in Table 1. These samples were characterized by the presence of 17 phenolic compounds, from which eight were classified as phenolic acids and nine as flavonoid glycoside derivatives. Phenolic acids were the most abundant phenolic compounds for all the studied ecotypes,

accounting for 63.4-70.7% of the total phenolic content for commercially cultivated ecotypes, while for wild and experimentally cultivated ecotypes the corresponding amount was approximately 70% and 90%, respectively (Table 2). The wild ecotypes (samples 4 and 5) had lower amounts of chicoric acid isomers compared to cultivated ecotypes and especially sample 3 (conventional commercial ecotype), which had the highest amount. Caftaric, 5-*O*-caffeoylquinic, fertaric, and 3,5-*O*-dicafeoylquinic acids were detected in higher amounts in sample 6, whereas the lowest amounts were detected in wild ecotype (sample 4).

Nevertheless, commercial samples 2 and 3 were very rich in flavonoids, especially kaempferol-*O*-glucuronide and quercetin-3-*O*-glucuronide, followed by kaempferol-3-*O*-glucuronide and isorhamnetin-3-*O*-glucuronide (Table 2), compared to the other ecotypes (wild and cultivated). Concerning growing conditions and cultivation practices, significant differences were detected between wild and cultivated plants, with wild ecotypes having significantly lower amounts of phenolic acids and flavonoids and consequently of total phenolic compounds, compared to cultivated plants.

Table 1. Retention time (Rt), wavelengths of maximum absorption in the visible region (λ_{max}), mass spectral data and tentative identification of phenolic compounds in *C. spinosum* leaves.

| Compound | Rt (min) | λ_{max} (nm) | Molecular ion | MS ² (<i>m/z</i>) | Tentative identification |
|----------|----------|-----------------------------|---------------|---|--|
| 1 | 5.1 | 328 | 311 | 179(85), 149(54), 135(100) | Caftaric acid |
| 2 | 8.2 | 328 | 353 | 191(100), 179(71), 135(43) | 5- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid |
| 3 | 14.8 | 330 | 473 | 313(68), 293(83), 219(13), 179(93), 149(100), 135(42) | <i>cis</i> -Chicoric acid |
| 4 | 14.9 | 330 | 473 | 313(68), 293(83), 219(13), 179(93), 149(100), 135(42) | <i>trans</i> -Chicoric acid |
| 5 | 19.5 | 312 | 457 | 295(100), 277(68), 219(26), 179(24), 163(58), 149(8) | Coutaric acid hexoside |
| 6 | 19.9 | 358 | 477 | 301(100) | Quercetin-3- <i>O</i> -glucuronide |
| 7 | 20.3 | 350 | 461 | 285(100) | Kaempferol- <i>O</i> -glucuronide |
| 8 | 21.2 | 310 | 295 | 219(27), 179(5), 163(22), 149(5), 135(11) | Coutaric acid |
| 9 | 21.2 | 330 | 325 | 193(100), 134(98) | Fertaric acid |
| 10 | 22.3 | 356 | 505 | 463(10), 301(100) | Quercetin-7- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -acetyl)glucoside |
| 11 | 22.6 | 328 | 515 | 353(), 191(98), 179(77), 161(4), 135(22) | 3,5- <i>O</i> -Dicafeoylquinic acid |
| 12 | 23.5 | 348 | 593 | 285(100) | Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside |
| 13 | 24.4 | 348 | 461 | 285(100) | Kaempferol-3- <i>O</i> -glucuronide |
| 14 | 25.2 | 336 | 445 | 269(100) | Apigenin- <i>O</i> -glucuronide |
| 15 | 25.5 | 358 | 491 | 315(100) | Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucuronide |
| 16 | 26.9 | 338 | 489 | 285(100) | Kaempferol-3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -acetyl)glucoside |
| 17 | 28.0 | 358 | 519 | 315(100) | Isorhamnetin-3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -acetyl)glucoside |

Table 2. Phenolic compound quantification (g/kg dry extract) in the studied *C. spinosum* ecotypes (mean±standard deviation).

| Compound | Phenolic compound | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 | Sample 4 | Sample 5 | Sample 6 |
|----------|--|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | Caftaric acid | 0.84 ± 0.03 | 0.49±0.01 | 1.50±0.01 | 0.30±0.02 | 0.84±0.03 | 2.39±0.02 |
| 2 | 5- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid | 3.32 ± 0.03 | 2.40±0.02 | 5.29±0.05 | 1.75±0.01 | 1.77±0.03 | 9.46±0.03 |
| 3 | <i>cis</i> -Chicoric acid | 16.85 ± 0.08 | 13.31±0.05 | 17.4±0.2 | 4.47±0.01 | 7.06±0.03 | 16.0±0.2 |
| 4 | <i>trans</i> -Chicoric acid | nd | 13.45±0.06 | 16.2±0.5 | 0.082±0.001 | 0.082±0.001 | 15.1±0.1 |
| 5 | Coutaric acid hexoside | 0.097 ± 0.003 | 0.71±0.02 | 1.04±0.04 | 0.037±0.001 | 0.16±0.01 | 0.57±0.02 |
| 6 | Quercetin-3- <i>O</i> -glucuronide | 0.951 ± 0.001 | 5.57±0.03 | 5.57±0.01 | 1.070±0.001 | 1.47±0.02 | 1.04±0.01 |
| 7 | Kaempferol- <i>O</i> -glucuronide | nd | 6.18±0.02 | 3.80±0.01 | 0.64±0.01 | 0.75±0.01 | 0.53±0.01 |
| 8 | Coutaric acid | tr | nd | nd | nd | nd | nd |
| 9 | Fertaric acid | 0.46 ± 0.03 | 2.45±0.05 | 3.27±0.05 | 0.36±0.01 | 1.01±0.01 | 6.45±0.04 |
| 10 | Quercetin-7- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -acetyl)glucoside | 0.050 ± 0.005 | 0.56±0.02 | 0.876±0.01 | tr | 0.204±0.002 | 0.53±0.03 |
| 11 | 3,5- <i>O</i> -Dicafeoylquinic acid | nd | 1.37±0.03 | 1.71±0.01 | 0.79±0.01 | 1.99±0.01 | 2.40±0.02 |
| 12 | Kaempferol-3- <i>O</i> -rutoside | 0.064 ± 0.002 | 0.094±0.002 | 0.070±0.003 | tr | 0.019±0.004 | tr |
| 13 | Kaempferol-3- <i>O</i> -glucuronide | 0.758 ± 0.005 | 3.13±0.02 | 3.35±0.05 | 0.90±0.01 | 1.02±0.01 | 0.62±0.01 |
| 14 | Apigenin-7- <i>O</i> -glucuronide | nd | 1.26±0.08 | 1.31±0.01 | 0.24±0.01 | 0.16±0.01 | 0.66±0.02 |
| 15 | Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucuronide | nd | 2.194±0.09 | 2.63±0.04 | 0.237±0.004 | 0.26±0.01 | 0.11±0.01 |
| 16 | Kaempferol-3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -acetyl)glucoside | 0.12 ± 0.01 | 0.54±0.04 | 0.84±0.01 | 0.12±0.01 | 0.38±0.01 | 0.26±0.01 |
| 17 | Isorhamnetin-3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -acetyl)glucoside | nd | 0.17±0.03 | 0.13±0.02 | 0.032±0.002 | 0.140±0.002 | 0.925±0.004 |
| | Total phenolic acids | 21.6 ± 0.3d | 34.2±0.2c | 46±1b | 7.79±0.01e | 12.9±0.1e | 52.3±0.3a |
| | Total flavonoids | 1.94 ± 0.01e | 19.7±0.1a | 18.6±0.2b | 3.24±0.04d | 4.40±0.02c | 4.7±0.1c |
| | Total phenolic compounds | 23.5 ± 0.3d | 53.9±0.1c | 65±1a | 11.04±0.05f | 17.3±0.1e | 57.0±0.1b |

tr- traces; nd- not detected. In each row, different letters mean significant statistical differences between samples ($p < 0.05$).

4. CONCLUSION

Cichorium spinosum L. phenolic compounds consist mainly of chicoric acid and 5-*O*-caffeoylquinic acid, while significant differences were observed among the studied ecotypes, as well as between the growing conditions (wild and cultivated); no significant differences were observed between the studied conventional and organic commercial products. Wild ecotypes had lower content of total phenolic compounds than cultivated ones, whereas commercial products were richer in flavonoids glycoside, in comparison to the other ecotypes.

Commercial cultivation of *C. spinosum* (either conventional or organic) should be encouraged since it ensures higher content of phenolic compounds and minimizes the danger of genetic erosion from irrational harvesting of wild plants.

Acknowledgements

FCT, Portugal and FEDER under Programme PT2020 for financial support to CIMO (UID/AGR/00690/2013), L. Barros contract, A. Fernandes (SFRH/BPD/114753/2016) and grateful to FEDER-Interreg España-Portugal programme for financial support through the project 0377_Iberphenol_6_E.

References

- [1] S A Petropoulos, A Fernandes, G Ntatsi, E Levizou, L Barros, I C F R Ferreira, LWT - Food Sci Technol, 2016, 73, 95-101.
- [2] M R Pérez-Gregorio, J Regueiro, J Simal-Gándara, AS Rodrigues, DPF Almeida, Crit Rev Food Sci Nutr, 2014, 54, 1050-1062.
- [3] E Klados, N Tzortzakakis, J Soil Sci Plant Nutr, 2014, 14, 211-222.
- [4] S A Petropoulos, E Levizou, G Ntatsi, A Fernandes, K Petrotos, K Akoumianakis, L Barros, I C F R Ferreira, Food Chem, 2017, 214, 129-136.

Composição nutricional e atividade antioxidante de macroalgas vermelhas provenientes de aquacultura sustentável

Filipa B. Pimentel^a, Vasco D. Teixeira^a, Anabela S.G. Costa^a, Rita C. Alves^a,
M. Beatriz P.P. Oliveira^{a*}

^aREQUIMTE, LAQV, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia,
Universidade do Porto, Porto, Portugal

* beatoliv@ff.up.pt

Palavras chave: Aquacultura sustentável; macroalgas; composição nutricional; atividade antioxidante.

RESUMO

As macroalgas são cada vez mais utilizadas como fonte de ingredientes funcionais e tecnológicos pelas indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica. Importa destacar que 90% da produção mundial de macroalgas provém de aquacultura, e que esta indústria tende a crescer de modo a fazer face às necessidades do mercado. O objetivo deste trabalho consistiu em caracterizar a composição nutricional e a atividade antioxidante de duas espécies de macroalgas produzidas em aquacultura, em Portugal – *Porphyra dioica* e *Gracilaria vermiculophylla*. Os resultados mostram que ambas as espécies são naturalmente ricas em fibra alimentar, minerais e uma fonte interessante de proteína vegetal. Além disso, usando um procedimento de extração simples, pouco demorado e solventes não-tóxicos, foi possível obter extratos ricos em compostos bioativos, o que reforça o conceito de sustentabilidade associado ao processo de cultivo destas macroalgas.

1. INTRODUÇÃO

Independentemente da sua origem, seja de produção controlada ou de colheita selvagem, as macroalgas são um ingrediente de valor acrescentado para uma vasta gama de aplicações [1]. Atualmente, é possível recorrer a ferramentas de engenharia ecológica, nomeadamente, à aquacultura multitrófica integrada, para aumentar a produção desta biomassa. Através destas práticas sustentáveis de aquacultura é possível regular a sua composição química e, ao mesmo tempo, atenuar os problemas ambientais associados à aquacultura animal tradicional [2], nomeadamente a carga ambiental dos efluentes gerados. A possibilidade de aumentar, de forma sustentável, a disponibilidade desta biomassa nos países ocidentais, onde esta prática é menos comum, abre novas oportunidades ao mercado. Surge, assim, um acesso facilitado a novas fontes de matérias-primas, produzidas localmente, aos consumidores não tradicionais, bem como às indústrias. O objetivo deste trabalho foi estudar a composição nutricional e a atividade antioxidante de duas espécies de macroalgas vermelhas produzidas num sistema de aquacultura multitrófica integrada, em Portugal: *P. dioica* e *G. vermiculophylla*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras

As duas espécies de macroalgas utilizadas neste estudo (*P. dioica* e *G. vermiculophylla*) foram produzidas em Portugal e cedidas pela empresa AlgaPlus, Lda. As amostras desidratadas foram

trituradas, homogeneizadas (Grindomix GM 200, Retsch, Haan, Alemanha) e devidamente acondicionadas.

2.2 Composição nutricional e atividade antioxidante

2.3 Análise nutricional

O estudo da composição nutricional foi efetuado de acordo com os métodos AOAC [3]: cinzas por incineração direta; teor proteico pelo método de Kjeldahl ($N \times 5$ [4]); gordura total pelo método de Soxhlet; e fibra alimentar total pelo método enzimático-gravimétrico [5]. O teor em humidade foi determinado utilizando uma balança equipada com uma lâmpada de infravermelhos (Scaltec modelo SMO01, Heiligenstadt, Germany). O teor em hidratos de carbono foi calculado por diferença.

2.4 Preparação dos extratos

Os extratos foram preparados por extração sólido-líquido, utilizando diferentes combinações de solventes (água, etanol/água (1:1, v/v) e etanol); rácio de amostra:volume de solvente extrator (1:30; 1:40 e 1:50, m/v); e tempo de extração (60'; 30' + 30'; e 30'). As extrações ($n=3$) foram efetuadas em placa com agitação constante a 550 rpm (Variomag, Telemodul 40 CT, Alemanha) à temperatura ambiente. Os extratos foram filtrados e, de seguida, determinados o teor em compostos fenólicos totais, em flavonoides totais e a atividade antioxidante.

2.4.1 Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais (FT) foram determinados por espectrofotometria, usando o método de Folin-Ciocalteu, com algumas modificações [6]. Resumidamente, 500 µl de extrato foram misturados com 2,5 ml do reagente de Folin-Ciocalteu (1:10) e 2 ml de uma solução de Na_2CO_3 (7,5%, m/v). A mistura foi incubada a 45 °C durante 15', seguindo-se 30' à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A absorvência foi lida a 765 nm. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de amostra (peso seco).

2.4.2 Flavonoides totais

Para a determinação dos flavonoides totais misturaram-se 1 ml de extrato com 4 ml de água destilada e 300 µl NaNO_2 a 25%. Após 5' de incubação à temperatura ambiente, adicionaram-se à mistura 300 µl de AlCl_3 a 10%. Após 1', adicionaram-se 2 ml de NaOH (1 M) e 2,4 ml de água ultrapura. A absorvência foi lida a 510 nm [6]. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de catequina/g de amostra (peso seco).

2.4.3 Atividade antioxidante

Para a determinação da capacidade de inibição do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH•) adicionaram-se 270 µl de uma solução etanólica de DPPH• ($6,0 \times 10^{-5}$ M) a 30 µl de extrato diluído. A diminuição da absorvência foi monitorizada a 525 nm, com intervalos de 2', durante 20'. Os resultados foram expressos em equivalentes de Trolox [6].

Para avaliar o poder redutor do íão férrico (FRAP), colocaram-se, em microplaca, 35 µl de extrato e 265 µl de reagente FRAP (20 ml de tampão acetato 0,3 M pH 3,6; 2 ml de solução 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM e 2 ml cloreto férrico 20 mM). A solução foi incubada ao abrigo da luz (37 °C, 30'). A absorvência foi lida a 595 nm. Os resultados foram expressos em equivalentes de sulfato ferroso (µM ESF/g amostra) [6].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fibra alimentar representa mais de um terço da composição de ambas as espécies (35-36%). Apesar de ambas apresentarem teores consideráveis em proteína e minerais, a *P. dioica* destaca-se no teor em proteína (26% vs 15%), enquanto que a *G. vermiculophylla* tem teores superiores em minerais (29% vs 19%). Outro aspeto de relevo é o baixo teor em gordura (<1%) das duas espécies.

O processo de otimização da extração dos FT foi efectuado com a *G. vermiculophylla*. De uma forma geral, a extração hidroetanólica, a par da aquosa, foi a mais eficiente, ao contrário do etanol que revelou pouca capacidade de extração. No que diz respeito ao rácio amostra:solvente e tempo de extração, 1:40 (m/v) durante 2 x 30' mostrou ser a melhor combinação para a extração. Com base nestes resultados, estas foram as condições aplicadas à segunda espécie em estudo – *P. dioica*.

A Tabela 1 mostra os resultados relativos à composição dos extratos aquosos, etanólicos e hidroetanólicos, quanto ao teor em FT, flavonoides totais e atividade antioxidante. Comparando ambas as espécies, observa-se que os extratos da *P. dioica* apresentam teores superiores de FT. Para a *P. dioica*, a extração aquosa parece ter sido mais eficiente do que a hidroetanólica ($2,93 \pm 0,14$ vs $2,32 \pm 0,14$ mg EAG/g amostra), quando comparadas às extrações equivalentes na *G. vermiculophylla* ($1,51 \pm 0,07$ vs $1,62 \pm 0,12$ mg EAG/g amostra). No que concerne à extração de flavonoides totais, a mistura hidroetanólica foi mais eficiente no caso da *G. vermiculophylla*. No entanto, no caso da *P. dioica*, não se observaram diferenças nos resultados obtidos entre os extrato aquoso e hidroetanólico ($0,45 \pm 0,03$ e $0,45 \pm 0,01$ mg Eq. catequina/g amostra, respetivamente).

Relativamente à atividade antioxidante, pelo método de FRAP, os extratos da *P. dioica* apresentam 3 a 6 vezes mais atividade do que os da *G. vermiculophylla*. À semelhança do que foi observado anteriormente, o extrato aquoso foi o que mostrou maior poder redutor ($15382,60 \pm 164,96$ µM ESF/g amostra), ao contrário do que se observou com a *G. vermiculophylla*, cujo poder redutor foi superior no extrato hidroetanólico. Nenhum dos extratos demonstrou capacidade de inibição do radical DPPH (<0,8 mg Eq. Trolox/g amostra).

Tabela 1. Composição dos extratos aquoso, etanólico e hidroetanólico das espécies em estudo quanto ao teor em compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante

| | | Extrato | | |
|--|---------------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| | Espécie | Aquoso | Etanólico | Hidroetanólico |
| Compostos bioativos | | | | |
| - Fenólicos totais (mg EAG/g) | <i>G. vermiculophylla</i> | 1,51 ± 0,07 | 0,05 ± 0,01 | 1,62 ± 0,12 |
| | <i>P. dioica</i> | 2,93 ± 0,14 | 0,94 ± 0,05 | 2,32 ± 0,14 |
| - Flavonoides totais (mg Eq. catequina/g) | <i>G. vermiculophylla</i> | 0,18 ± 0,00 | 0,14 ± 0,00 | 0,37 ± 0,02 |
| | <i>P. dioica</i> | 0,45 ± 0,03 | 0,13 ± 0,00 | 0,45 ± 0,01 |
| Atividade antioxidante | | | | |
| - FRAP (µM ESF/g) | <i>G. vermiculophylla</i> | 3963,85 ± 270,78 | 506,86 ± 17,07 | 4885,29 ± 161,77 |
| | <i>P. dioica</i> | 15382,60 ± 164,96 | 3407,93 ± 327,41 | 15172,63 ± 442,50 |
| - DPPH• (mg Eq. Trolox/g) | <i>G. vermiculophylla</i> | s.a. | s.a. | s.a. |
| | <i>P. dioica</i> | 0,33 ± 0,06 | s.a. | 0,76 ± 0,04 |

Legenda. EAG, equivalentes de ácido gálico; Eq., equivalentes; ESF, equivalentes de sulfato ferroso; s.a., sem atividade.

4. CONCLUSÕES

Os resultados mostram que ambas as espécies são naturalmente ricas em fibra alimentar, minerais e uma fonte interessante de proteína vegetal. Além disso, demonstram que, usando um procedimento de extração simples, pouco demorado e solventes não-tóxicos, foi possível obter extratos ricos em compostos bioativos, o que reforça o conceito de sustentabilidade associado ao processo de cultivo destas macroalgas.

Agradecimentos

Filipa B. Pimentel agradece à FCT a bolsa de doutoramento (SFRH/BD/109042/2015), financiada pelo MCTES e FSE através do POCH – Programa Operacional Capital Humano. Os autores agradecem à AlgaPlus, Lda. a cedência das amostras. Este trabalho recebeu apoio financeiro do projeto Operação NORTE-01-0145-FEDER-000011 - Qualidade e Segurança Alimentar - uma abordagem (nano)tecnológica e do projeto UID/QUI/50006/2013 - POCI/01/0145/FEDER/007265, apoiado pela FCT/MEC através de fundos nacionais e cofinanciado pelo FEDER.

Referências

- [1] FB Pimentel, RC Alves, F Rodrigues, MBPP Oliveira, *Cosmetics* 2018, 5, 2.
- [2] Abreu, M. H.; Pereira, R.; Yarish, C.; Buschmann, A. H.; Sousa-Pinto, I. *Aquaculture* 2011, 312, 77-87.
- [3] AOAC. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 19th Edition AOAC International 2012: Maryland, EUA.
- [4] AR Angell, L Mata, R de Nys, NA Paul, *J Appl Phy* 2016, 28, 511-524.
- [5] Total Dietary Fiber Assay Kit, Technical Bulletin - Product Codes: TDF-100A and TDF-C10 TDF-100A Kit. Sigma, St. Louis, USA.
- [6] ASG Costa, RC Alves, AF Vinha, SVP Barreira, MA Nunes, LM Cunha, MBPP Oliveira, *Ind Crop Prod*, 2014, 53, 350-357.

Effect of ion exchange resins on white and red wine pH: Impact on wine sensory characteristics

Rita Borges *a, c*, Conceição Fernandes^{*}, Celeste Marques^b, Carlos Matos^c, Alice Vilela^c, Filipe-Ribeiro, L. *c*, Fernando M. Nunes^c, Fernanda Cosmec^{**}

^a Mountain Research Centre (CIMO), ESA-Polytechnic Institute of Bragança, Portugal

^b AEB Bioquímica Portuguesa SA, Zona Industrial de Coimbrões, Viseu, Portugal

^c Chemical Research Centre (CQ-VR), Food and Wine Chemistry Lab, UTAD – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

^{*}conceicao.fernandes@ipb.pt ; ^{**} fcosme@utad.pt

Keywords: White wine; red wine; pH; acidity; ion exchange resins; sensory quality.

ABSTRACT

The pH control during winemaking is a fundamental parameter by their influence on colour, freshness and to achieve wine microbiological stability. The application of ion exchange resins for wine acidification is based on ability of exchanging ions fixed on functional groups, namely by exchanging cations, such as potassium, with hydrogen ions. Nevertheless, there is an important lack of knowledge on the impact of this operation on wine sensory characteristics. Therefore, the aim of this work was to evaluate the effect of cation exchange resins, on wine pH control and to evaluate their impact on wine sensory quality at industrial scale. In this study a white and a red wine, both from the Douro Valley demarcated region, 2015 vintage, were used. The ion exchange resin treated wine was almost 20% from total white wine volume and almost 30% from total red wine volume. The results obtained in the present study indicated that there were no considerable changes in sensory attributes, although a slight improvement in the aroma and taste, as a result of the ion-exchange pH adjustment. Therefore, the application of ion exchange resins process to wine could be an interesting tool for white and red wine pH adjustment, without interfering with wine sensory quality.

1. INTRODUCTION

Wine pH and acidity control during winemaking is vital for maintaining the wine quality during storage. The most common acidify correction performed in wineries is addition of natural tartaric acid; however, in some cases, this operation increases the risks of potassium bitartrate precipitations [1, 2]. Resin-based ion exchange have been investigated to adjust wine acidity and pH since the 1950s [3]. However, ion-exchange resin technology is accepted for the wine pH reduction only from 2000, according to the OIV Resolution 43/2000 [1]. The most use ion exchange resins involves cation-exchange resins in the hydrogen form, for increasing acidity and removing potassium from wine. To adjust wine pH, a certain amount of treated wine by ion exchange resins is mixed with the untreated wine [4]. According to OIV [5], treatment must not lower the wine pH below 3.00 and the decrease should not exceed 0.30 pH units. Anion exchangers are not allowed by the OIV [3] due to the negative effects on the wine sensory quality [6, 7]. So, the aim of this study was to evaluate, at industrial scale, the effect of cation exchange resins on wine pH control and consequently their impact on wine sensory quality, in white and red wine from the Douro Valley Demarcated Region, 2015 vintage.

2. MATERIAL AND METHODS

Wine characteristics: A young white wine and red wine from Douro Valley Demarcated Region, vintage 2015, was used. Chemical characteristics of white wine and red wine were as follow, respectively: Alcohol content 13.0% and 12.0%, titratable acidity 5.1 g/L and 4.9 (expressed as tartaric acid), volatile acidity 0.27 g/L and 0.38 g/L (expressed as acetic acid) and pH 3.32 and 3.61.

Experimental design: Treatments using cation exchange resins pH-Stab/AEB laboratory, was performed in a winery at industrial scale, being the treated wine almost 20% from the total volume for the white wine and 30 % of the total volume for the red wine. All experiments were run in duplicate.

pH and titratable acidity: Wine pH and titratable acidity (tartaric acid in g/L) were determined according OIV [8].

Mineral composition: Potassium, calcium and magnesium were measured by atomic absorption flame spectrophotometry, according to the methods described by OIV [8].

Sensory analysis: A trained panel of 7 members was used for sensory analysis. Samples were stored at appropriate light and temperature conditions, and were presented to panellists in tasting glasses, marked with three-digit numbers, in a randomised order. Fifteen attributes were selected: visual (*limpidity, colour*), aroma (*aroma intensity, fruity, floral, vegetable, oxidised, chemist*) and taste (*sweetness, bitterness, acidity, flavour intensity, body, balance, persistence*). The attributes were quantified using a five-point intensity scale [9], in individual booths [10] and according to standardised procedures [11].

Statistical analysis: Data are presented as means \pm standard deviation. Physicochemical and sensory data were statistically tested by analysis of variance (ANOVA) using the Statistica 7 software (Statsoft, Tulsa, Oklahoma, USA). Tukey honestly significant differences test was applied ($p < 5\%$) for physicochemical data and Duncan test for sensory analysis data ($p < 5\%$).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Effect of ion exchange resins on white and red wine pH, titratable acidity and mineral composition

As expected ion exchange resin treatment lowered the pH of white wine, namely from 3.32 to 3.10 and the pH of red wine from 3.61 to 3.31 as shown in table 1. Titratable acidity increased, in both wines, after ion exchange resin treatment, as compared to the control wine, due to the increased hydrogen content of the pH-adjusted wines.

Table 1. Titratable acidity and pH of the control wines and wines after cation exchange resin treatment (mean \pm SD).

| | White wine | | Red wine | |
|----------------|------------------------------|--|------------------------------|--|
| | pH | Titratable acidity (g of tartaric acid/L) | pH | Titratable acidity (g of tartaric acid/L) |
| Control | 3.32 \pm 0.00 ^a | 5.10 \pm 0.29 ^a | 3.61 \pm 0.00 ^a | 4.87 \pm 0.31 ^a |
| Resins | 3.10 \pm 0.00 ^b | 6.15 \pm 0.48 ^b | 3.31 \pm 0.00 ^b | 6.58 \pm 0.08 ^b |

Means within a column followed by different letter are significantly different ($p < 0.05$).

Ion exchange resin lowered potassium and magnesium concentration in white and red wine. However, calcium only decreased significantly in red wine treated with ion exchange resin (Table 2).

Table 2. Mineral composition (potassium, calcium and magnesium) of the control wine and wine after cation exchange resin treatment (mean \pm SD).

| | White wine | | | Red wine | | |
|----------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Potassium (mg/L) | Calcium (mg/L) | Magnesium (mg/L) | Potassium (mg/L) | Calcium (mg/L) | Magnesium (mg/L) |
| Control | 770.56 \pm 69.64 ^a | 22.20 \pm 1.27 ^a | 84.22 \pm 0.19 ^a | 1092.68 \pm 8.73 ^a | 52.15 \pm 2.43 ^a | 86.96 \pm 0.36 ^a |
| Resins | 473.43 \pm 24.89 ^b | 19.45 \pm 0.92 ^a | 71.72 \pm 0.83 ^b | 696.93 \pm 1.99 ^b | 31.57 \pm 2.42 ^b | 51.67 \pm 0.30 ^b |

Means within a column followed by different letter are significantly different ($p < 0.05$).

The decrease observed in pH and potassium concentration of both wines indicated that ion exchange resin was effective in exchanging potassium for hydrogen.

3.2 Effect of ion exchange resins on white and red wine sensory characteristics

After white and red wine sensory analyses no significant differences were observed among the wine treated with ion exchange resins and the control, for all the wine attributes evaluated. However, it was observed that the white wine treated with ion exchange resins was more scored for attributes *flavour intensity*, *fruity flavour* and *persistence* and the red wine treated with ion exchange resin was more scored for the attributes *red fruits aroma* and *red fruits flavour* and for the attributes *floral aroma* and *floral flavour* (Figure 1).

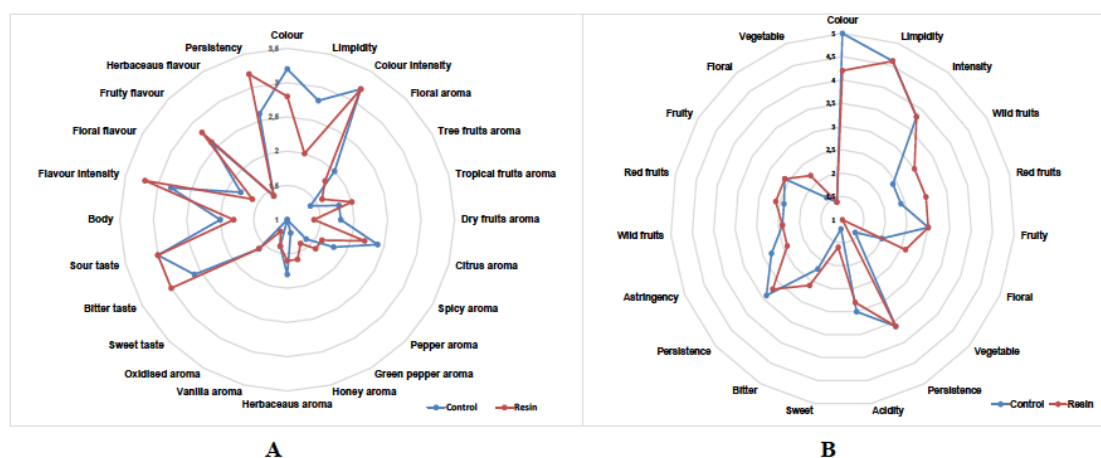


Figure 1. Sensory profile of the white wine (A) and red wine (B) treated with ion exchange resin (red-line) and control wine (blue-line).

3. CONCLUSIONS

Results showed, as expected, that ion exchange resin treatment lowered the pH of white and red wine and consequently increased the titratable acidity of both wines. In both wines, a significant decrease in the potassium and magnesium cations was verified, whereas calcium only decreased significantly in red wine. Sensory analysis revealed that treated wines present identical performance relative to the control wines. So, results from this work showed that the use of ion exchange resin to adjust white and red wines pH could be a good solution for wine industry.

Acknowledgements

This work was funded by the Chemical Research Centre (CQ-UTAD). AEB Bioquímica Portuguesa is also gratefully acknowledged.

References

- [1] H W Berg, R M Keefer, *Am J Enol Viticult*, 1958, 9,180–183.
- [2] B Ratsimba, C Laguerie, B Biscans, M Gaillard, *Bull. Soc. Chim. Fr*, 1989, 3, 325–330
- [3] W R Bonorden, C W Nagel, J R Powers, *Am J Enol Vitic*, 1986, 37, 143-148.
- [4] O.I.V. Resolution OENO 43/2000
- [5] O.I.V. Resolution OENO 443/2012
- [6] H Mira, P Leite, J M Ricardo-da-Silva, A S Curvelo-Garcia, *J Int Sci Vigne Vin*, 2006, 40, 223–246.
- [7] C Lasanta, I Caro, L Pérez, *Food Chem*, 2013, 138, 1072–1078.
- [8] OIV. Paris: Edition Officielle, 2012.
- [9] ISO 4121, 2003. Guidelines for the use of quantitative response scales. Retrieved from. <https://www.iso.org/standard/33817.html>
- [10] ISO 8589, 2007. General guidance for the design of test rooms. Retrieved from. <https://www.iso.org/standard/36385.html>.
- [11] ISO 3591, 1977. Sensory analysis -- Apparatus -- Wine-tasting glass. Retrieved from <https://www.iso.org/standard/9002.html>.

Tartrate stabilisation of rosé wine using ion exchange resins: Impact on wine sensory characteristics

Rita Borges *a, c*, Conceição Fernandes^{*}, Celeste Marques^b, Carlos Matos^c, Alice Vilela^c, Filipe-Ribeiro, L. *c*, Fernando M. Nunes^c, Fernanda Cosme^{**}

^a Mountain Research Centre (CIMO), ESA-Polytechnic Institute of Bragança, Portugal

^b AEB Bioquímica Portuguesa SA, Zona Industrial de Coimbrões, Viseu, Portugal

^c Chemical Research Centre (CQ-VR), Food and Wine Chemistry Lab, UTAD – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal
[*conceicao.fernandes@ipb.pt](mailto:conceicao.fernandes@ipb.pt); [** fcosme@utad.pt](mailto:fcosme@utad.pt)

Keywords: Rosé wine; ion exchange resins; tartaric stability; oenological stabilisers; sensory quality.

ABSTRACT

Tartaric precipitation in bottled wine is an important problem for the wine industry by the undesirable aspect. Addition of certain stabilisers, such as metatartaric acid and carboxymethylcellulose (CMC), or treatment of wine with ion exchange resins, are accepted by the OIV and have been successfully used to prevent tartaric precipitation. However, there are few studies regarding rosé wine. So, the aim of this study was to evaluate the effect of cation exchange resins on rosé wine tartaric stabilisation efficiency and wine sensory quality, compared to the effect of oenological stabilisers. In this study a rosé wine from the Douro Valley Demarcated Region, 2015 vintage, was used and ion exchange resin *versus* CMC's, with different structural features, as well as metatartaric acid, were tested. The cation exchange resins process could be a useful tool to stabilise wine, as the sensory analysis data showed, since wine treatment with cation exchange resin are lesser scored for colour intensity attribute and significantly more scored for the limpidity attribute. These results show that ion exchange resins could be an interesting process for rosé wine tartaric stabilisation.

1. INTRODUCTION

Tartaric precipitation in bottled wine is an important problem considering that it is essential to satisfy the wine quality criteria, and consequently the wine consumer's acceptance. So, wineries employed several treatments to prevent this precipitation. For instance, according to Resolution 43/2000 [1], the addition of stabilisers, such as metatartaric acid and carboxymethylcellulose, or the treatment with ion exchange resins, are accepted and have been successfully used to prevent tartaric precipitation in white and red wine [2,3]. The main difference concerning these two stabilisation processes is that the ion exchange resins removes the compounds that contribute to tartrate instability. Anion exchangers are not allowed by the OIV [1] due to the negative effects on the wine physiochemical and sensory quality [4,5]. Rosé wine consumption shows an increase in the last years (between 2008 and 2014), representing nowadays near 10% of the world wine production. However, according to our knowledge, there are no studies in rosé wine concerning cation exchange resins application for tartaric stabilisation. So, the aim of this study was to evaluate effect of cation exchange resins on tartaric stabilisation efficiency and their impact on rosé wine sensory quality, compared to addition of conventional oenological additives.

2. MATERIAL AND METHODS

Wine characteristics: A young rosé wine from Douro Valley Demarcated Region, vintage 2015, with tartaric instability was used. Chemical characteristics of wine were as follow: Alcohol content 11.1%, titratable acidity 6.6 g/L (expressed as tartaric acid), volatile acidity 0.18 g/L (expressed as acetic acid) and pH 3.22.

Stability treatments: Treatments were performed with three kinds of CMC's, two in liquid form, CMC1 5% (w/v) and CMC2 20% (w/v), and the CMC3 in powder, all with different structural characteristics [2], and metatartaric acid (Meta. A) all of them applied at 100 mg/L, according to the maximum allowed by OIV [6]. Each additive was prepared according to the manufacturer's specifications. Wine without treatment was used as a control. All treatments were conducted in 250 mL flasks, additives were thoroughly mixed, added to each treatment and allowed to remain in contact with the wines for 7 days at 20 °C. The rosé wine was also stabilised by cation exchange resins, that was performed in a winery at semi-industrial scale, that treated almost 30% from the total volume of the wine. Samples were then centrifuged at 537.6 g for 15 min before analysis. All experiments were run in duplicate.

Mini contact test: Wine tartaric stability was measured by mini contact test and was carried out by a Tartar Check (Ing.C.Bullio, San Prospero, Italy).

Colour and chromatic characteristics: Wine colour (absorbance at 420 nm) and chromatic characteristics [scanned from a range of 380–770 nm to collect data to determine L^* (lightness), a^* (redness), and b^* (yellowness) coordinates using the CIELab method] were determined according OIV [6]. To distinguish the colour more accurately, the differences were calculated using the following equation: $\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$.

Sensory analysis: A trained panel was used for sensory analysis. Samples were stored at appropriate light and temperature conditions, and were presented to panellists in tasting glasses, marked with three-digit numbers, in a randomised order. Twenty attributes were selected: visual (*limpidity, colour intensity, rose colour*), aroma (*aroma intensity, wild fruits, brandy plums, fruity, floral, vegetable, aroma persistence*), taste (*sweet, bitter, taste persistence, acidity, astringency*) and flavour (*dried fruits, fruity flavour, vegetable flavour, caramel*). The attributes were quantified using a five-point intensity scale where the minimum value was 1 and the maximum 5, integer values [7], in an individual booth [8] and according to standardised procedures [9].

Statistical analysis: Data are presented as means \pm standard deviation. Physicochemical data was statistically tested by analysis of variance (ANOVA) using the Statistica 7 software (Statsoft, Tulsa, Oklahoma, USA). Tukey honestly significant differences test was applied ($p < 5\%$). The wine's sensory attributes were submitted to a Principal Components Analysis based in a covariance matrix (Cov-PCA) performed by the Statistica 2010 software (Statsoft Inc., 2012).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Effect of treatments on rosé wine tartaric stability, colour and chromatic characteristics

As expected all treatments stabilised rosé wine. Wine treated with cation exchange resins showed a significant decrease in colour intensity, that is in line with the significant decrease observed in the a^* - redness coordinate obtained with the CIELab method (Table 1). However, total colour difference (ΔE) do not showed significant difference, and it is lower than 2 units, which means that the differences were not detected by the Human eyes.

Table 1. Rosé wine chromatic characteristics and colour intensity of the control wine and wine after stability treatment (mean \pm SD).

| | <i>L</i> * | <i>a</i> * | <i>b</i> * | ΔE | Colour intensity (a.u.) |
|---------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Control | 99.2 \pm 0.2 ^a | 2.22 \pm 0.19 ^a | 0.95 \pm 0.02 ^a | - | 0.45 \pm 0.02 ^a |
| Meta. A | 99.1 \pm 0.6 ^a | 2.36 \pm 0.04 ^a | 1.04 \pm 0.03 ^a | 0.55 \pm 0.12 ^a | 0.44 \pm 0.02 ^a |
| CMC 1 | 98.9 \pm 0.9 ^a | 2.33 \pm 0.07 ^a | 1.05 \pm 0.11 ^a | 0.88 \pm 0.47 ^a | 0.42 \pm 0.00 ^a |
| CMC 2 | 98.9 \pm 1.1 ^a | 2.30 \pm 0.11 ^a | 1.06 \pm 0.09 ^a | 0.67 \pm 0.40 ^a | 0.38 \pm 0.01 ^a |
| CMC 3 | 99.6 \pm 0.1 ^a | 2.30 \pm 0.03 ^a | 1.01 \pm 0.01 ^a | 0.40 \pm 0.37 ^a | 0.39 \pm 0.01 ^a |
| Resins | 99.9 \pm 0.1 ^a | 1.39 \pm 0.10 ^b | 1.02 \pm 0.10 ^a | 1.06 \pm 0.00 ^a | 0.25 \pm 0.02 ^b |

*L** – lightness, *a** – redness, *b** – yellowness, ΔE – total colour difference- obtained taking as a reference the control wine; Means within a column followed by different letter are significantly different ($p < 0.05$).

3.2 Effect on rosé wine sensory characteristics

The PCA (Figure 1) resulting for the wine's sensory attributes projected onto the first two PCs, as well as the treatments (CMC, resins and metatartaric acid). The PC1 explained 57.80 % of the total variance and the attribute “limpidity” is the value with largest contribution in PC1. The attributes that best correlated with PC2 (that accounted for 20.26 % of total variation) were the “bitter taste” and the “rosé colour”. Resin and CMC2 imprinted the wines with “fruity” and “sweet” characteristics, while the CMC1 and CMC3 imprinted the wines with a “floral aroma”. Wine treated with metatartaric acid is essentially more “acid” and “bitter” in terms of mouth-feel and more intense in terms of “colour”. Is interesting to note that the control wine (wine without any stabilisation treatment), positioned, alone, in the lower right PCA quadrants characterised with almost all the aroma and flavour attributes.

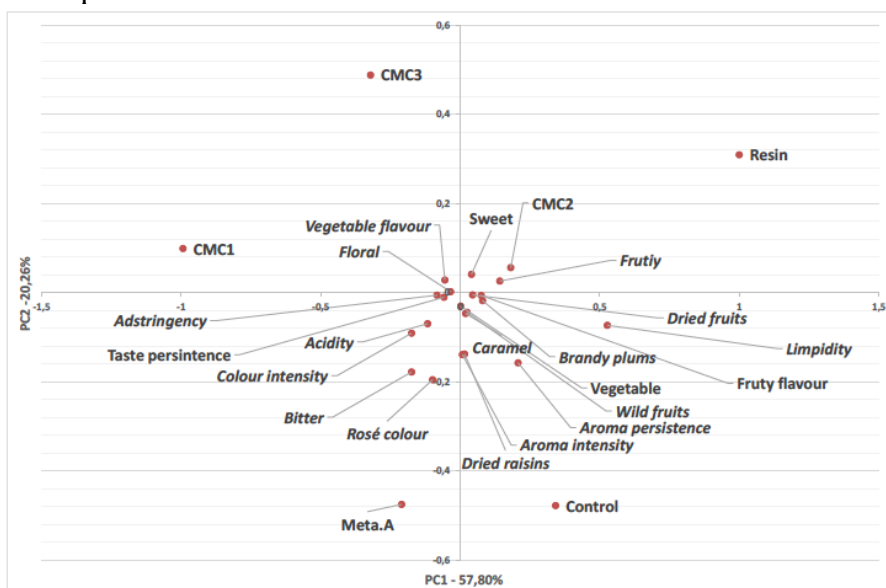


Figure 1. Principal Components Analysis (PCA) based on covariance (Cov-PCA) projection of the sensory attributes evaluated in the wines treated with CMC (1, 2 and 3), resins or metatartaric acid, and control wine.

4. CONCLUSIONS

Results showed that all treatments studied stabilised the rosé wine. Colour intensity showed a significant decrease after treatment with ion exchange resins, which is in line with the chromatic characteristics obtained by CIELab method – *a**. Sensory analysis revealed that wine treatment with cation exchange resin are significantly lesser scored in the colour intensity attribute and significantly more scored for the limpidity attribute.

Acknowledgements

This work was funded by the Chemical Research Centre (CQ-UTAD). Additional thanks to AEB Bioquímica Portuguesa.

References

- [1] O.I.V. Resolution OENO 43/2000
- [2] R Guise, L Filipe-Ribeiro, D Nascimento, O Bessa, F M Nunes, F Cosme, Food Chem, 2014, 156, 250-257.
- [3] V Ibeas, A Correia, A Jordão, Food Res Int.,2015, 69, 364-372.
- [4] H Mira, P Leite, J M Ricardo-da-Silva, A S Curvelo-Garcia, J Int Sci Vigne Vin, 2006, 40, 223–246.
- [5] C Lasanta, I.Caro, L Pérez, Food Chem 2013, 138, 1072–1078.
- [6] OIV. Paris: Edition Officielle, 2012.
- [7] ISO 4121, 2003. Guidelines for the use of quantitative response scales. Retrieved from. <https://www.iso.org/standard/33817.html>
- [8] ISO 8589, 2007. General guidance for the design of test rooms. Retrieved from. <https://www.iso.org/standard/36385.html>
- [9] ISO 3591, 1977. Sensory analysis -- Apparatus -- Wine-tasting glass. Retrieved from <https://www.iso.org/standard/9002.html>

Aplicação em waffles de um corante natural obtido de frutos de *Arbutus unedo* L.

Cecilia Jiménez López^a, Cristina Caleja^{a,b}, Rúbia C. G. Corrêa^a, Maria Inês Dias^a, M.A. Prieto^{a,c}, Maria Filomena Barreiro^{a,b}, Lillian Barros^a, Isabel C.F.R. Ferreira^{a*}

^aCentro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal

^bLaboratório de Processos de Separação e Reação - Laboratório de Catálise e Materiais (LSRE-LCM), Instituto Politécnico de Bragança, Portugal

^cGrupo de nutrição e bromatologia, Faculdade de Ciência e Tecnologia Alimentar, Universidade de Vigo, Ourense, Espanha

* iferreira@ipb.pt

Palavras chave: Aditivos; *Arbutus unedo*; corante; waffles.

RESUMO

Os corantes são um dos aditivos mais importantes em termos de marketing, uma vez que a cor pode influenciar diretamente as escolhas e preferências dos consumidores [1]. No entanto, têm sido descritos alguns efeitos indesejáveis de determinados corantes artificiais. Contrariamente, os corantes naturais (e.g. ricos em compostos antociânicos) são genericamente considerados inofensivos, para além de poderem proporcionar efeitos bioativos [2]. Neste estudo, um extrato rico em antocianinas, obtido a partir de frutos de *Arbutus unedo* L. (medronho), foi aplicado como corante natural num produto de pastelaria. Para a preparação do extrato, otimizou-se o processo de extração utilizando duas metodologias: extração assistida por calor e extração assistida por ultrassons, de forma a obter as condições que maximizam a concentração de antocianinas. Foi aplicada uma metodologia de superfície de resposta, seguindo um delineamento experimental de 5 níveis e as respostas foram obtidas através de HPLC-DAD-ESI/MS, onde foram identificados três compostos antociânicos; a cianidina-3-glucósido foi a molécula maioritária. A técnica de extração assistida por calor demonstrou ser o método mais eficaz para a extração de antocianinas, produzindo 51,2% de extrato, com um teor total de antocianinas de 382,4 µg/g fruto seco e 744,6 µg/g de extrato, nas condições ótimas de 5 minutos, 90°C, 80% de etanol e 15 g/L de razão sólido: líquido. Posteriormente, o extrato foi incorporado em waffles, tendo-se avaliado a sua composição em macronutrientes, bem como em açúcares livres e ácidos gordos, ao longo de 6 dias de armazenamento. Os resultados obtidos demonstraram que a incorporação do extrato não causou alterações nos componentes nutricionais. Validam também a possibilidade de utilizar frutos de *A. unedo* como fonte de compostos antociânicos muito interessantes para utilização como corantes alimentares naturais.

1. INTRODUÇÃO

São vários os corantes artificiais adicionados a produtos alimentares que têm sido associados a efeitos indesejáveis para o consumidor, tais como alergias e hiperatividade. Já muitos corantes naturais têm surgido como seguros para o consumidor, para além de poderem exibir uma ação dupla, ou seja, coloração e efeitos bioativos (por exemplo, atividade antioxidante) [2]. Desta forma, a indústria alimentar tem vindo a estudar a possibilidade de substituição de aditivos

artificiais por alternativas naturais [3]. Vários estudos mostraram que extratos ricos em antocianinas para além do seu potencial corante, apresentam efeitos benéficos para a saúde do consumidor nomeadamente, propriedades antioxidantes, antimicrobianas, quimioprotetoras e antidiabéticas [1]. Os frutos de *Arbutus unedo* L., popularmente conhecidos como medronho, apresentam várias antocianinas na sua composição o que os torna uma fonte natural desta família de compostos com potencial interesse para aplicações industriais [2]. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi otimizar as condições de extração de antocianinas a partir de frutos de *A. unedo*. Por conseguinte, foram estudadas e comparadas duas metodologias de extração. O efeito conjunto das variáveis relevantes para cada técnica, no sentido de maximizar o rendimento da extração de antocianinas, foi descrito através de uma metodologia de superfície de resposta. O extrato foi incorporado em waffles, tendo sido avaliados ao longo do tempo de armazenamento os efeitos no perfil nutricional, açúcares livres, ácidos gordos e atividade antioxidante dos produtos finais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e preparação dos extratos

As amostras liofilizadas de frutos de *A. unedo* (medronho) foram reduzidas a pó e submetidas a duas técnicas de extração de forma a obter um extrato rico em antocianinas. A relação sólido/líquido foi mantida constante a 30 g/L. A extração assistida por calor (EAC) foi realizada adicionando 600 mg da amostra a 20 mL do solvente selecionado. As variáveis e intervalos testados foram tempo (t , 30 a 150 min), temperatura (T , 30 a 90 °C) e teor de etanol (S , 0 a 100%). Por sua vez, na extração assistida por ultrassons (EAU) colocou-se 1,5 g de amostra em 50 mL de solvente. As variáveis e intervalos testados foram tempo (t , 3 a 45 min), potência (P , 100 a 500 W) e o teor em etanol (S , 0 a 100%). A mistura foi posteriormente filtrada, evaporada, congelada e liofilizada.

2.2. Identificação de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detetores de díodos e de espectrometria de massa (HPLC-DAD-ESI/MS) [4].

2.3. Metodologia de superfície de resposta (MSR)

De forma a obter as condições ótimas que permitem maximizar a extração de antocianinas a partir de frutos de *A. unedo*, foi aplicada uma metodologia de superfície de resposta, seguindo um delineamento experimental de 5 níveis [4].

2.4. Incorporação em waffles

Para a preparação dos waffles foi seguida uma receita tradicional utilizando como ingredientes: farinha de trigo, açúcar, fermento em pó, manteiga, ovos e sumo de limão. Foram preparados dois grupos de waffles: waffles controlo (sem aditivos corantes); e waffles com o extrato de *A. unedo* rico em cianidina-3-*O*-glucósido (5,50 g). As amostras foram analisadas imediatamente após a sua preparação e após três e seis dias de tempo de prateleira (armazenadas a 5 °C). Todas as amostras foram posteriormente liofilizadas e trituradas.

2.5. Avaliação dos parâmetros nutricionais, físico-químicos e atividade antioxidante

Todas as amostras foram analisadas em termos de parâmetros nutricionais (teor em humidade, proteína, gordura, cinzas e hidratos de carbono), físico-químicos (medição da cor e pH) e atividade antioxidante (efeito captador de radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo- DPPH e poder redutor).

2.6. Análise estatística

Os resultados foram analisados por meio do teste *t*-Student para determinar a diferença significativa entre menos de três amostras diferentes, com $p = 0,05$ (Programa SPSS v. 23.0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os frutos de *A. unedo* apresentaram na sua composição três antocianinas: delphinidina-3-glucósido, cianidina-3-pentósido e cianidina-3-glucósido, sendo a última a mais abundante, como já tinha sido descrito anteriormente pelos autores [2]. A EAC demonstrou ser o método mais eficaz para a extração de antocianinas, produzindo 51,2% de extrato, com um teor total de antocianinas de 382,4 µg/g fruto seco e 744,6 µg/g de extrato, nas condições ótimas de 5 minutos, 90°C, 80% de etanol e 15 g/L da razão sólido/líquido.

Para verificar os efeitos da aplicação deste extrato num produto alimentar procedeu-se à avaliação das alterações causadas na cor, pH e composição nutricional ao longo do tempo de armazenamento. Os resultados demonstram que a incorporação do extrato de *A. unedo* rico em cianidina-3-glucósido conferiu uma cor mais dourada às waffles (**Figura 1A**), quando comparada com as waffles controlo (**Figura 1B**). Os resultados mostraram que a incorporação do extrato não causou alterações significativas no perfil nutricional em relação à amostra controlo, para todos os tempos de armazenamento, sendo que os hidratos de carbono foram os macronutrientes mais abundantes. Foram detetados três açúcares individuais: frutose, glucose e sacarose, apresentando as waffles incorporadas com o extrato quantidades mais elevadas relativamente às amostras controlo (**Figura 2A**). Este facto poderá estar relacionado com a presença destes açúcares nos frutos de *A. unedo* [2]. Os ácidos gordos mais abundantes foram os ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) e linoleico (C18:2n6) sendo que, a incorporação do extrato não causou alterações significativas no perfil de ácidos gordos (**Figura 2B**). Relativamente à atividade antioxidante, verificou-se que a incorporação do extrato forneceu propriedades significativamente benéficas o que seria espectável tendo em conta estudos semelhantes anteriormente realizados [5,6].

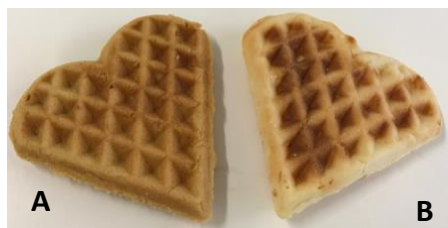


Figura 1. Aspeto exterior das waffles incorporadas com o extrato rico em cianidina-3-glucósido de frutos de *A. unedo* (A) e waffles controlo (B).

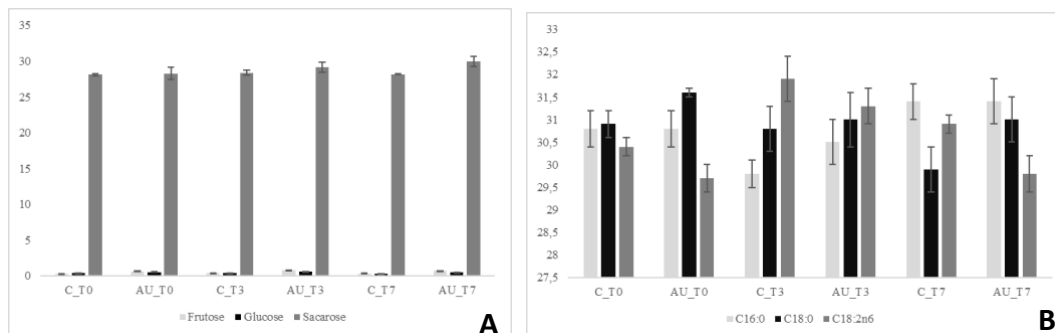


Figura 2. Perfil de açúcares (A) e ácidos gordos maioritários (B) nas waffles incorporadas com o extrato rico em cianidina-3-glucósido de frutos de *A. unedo* (AU) e waffles controlo (C) ao longo do tempo de armazenamento.

4. Conclusões

Os frutos de *A. unedo* surgem como uma fonte natural de antocianinas, com potencial interesse a nível industrial, como fontes naturais de ingredientes corantes. No geral, a incorporação do extrato de *A. unedo* conferiu uma cor mais atraente às waffles e melhorou a atividade antioxidante, sem causar alterações significativas no seu perfil nutricional.

Agradecimentos

FCT, Portugal e ao FEDER no âmbito do programa PT2020 pelo apoio financeiro ao CIMO (UID/AGR/00690/2013), bolsa de C. Caleja (SFRH/BD/93007/2013) e contrato de L. Barros; FEDER através do Programa Operacional Regional Norte 2020, no âmbito do Projeto Norte-01-0247-FEDER-024479: ValorNatural®; FEDER-Interreg España-Portugal no âmbito do Projeto 0377_Iberphenol_6_E. Xunta de Galicia pelo apoio financeiro a M.A. Prieto.



Referências

- [1] M Carocho, MF Barreiro, P Morales, ICFR Ferreira. Comp Rev Food Sci Food Saf, 2014, 13, 377–399.
- [2] BR Albuquerque, et al, Ind Crop Prod, 2016, 95, 404–415.
- [3] J Pinela, ICFR Ferreira, Crit Rev Food Sci Nutr, 2017 57(10), 2095–2111.
- [4] L Jiménez, et al, Food Chem, 2018, 264, 81–91.
- [5] C Caleja, et al, Food Chem, 2017, 216, 342–346.
- [6] S Takwa, et al, LWT – Food Sci Tec, 2018, 88, 47–55.

***Coix lachryma-jobi*: A new promising cereal as functional food with important nutritional value**

Thelma B. Machado^{1,2}, Anabela S. G. Costa², Maria Beatriz P. P. Oliveira²

¹*Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Rua Dr. Mário Viana, 523, Santa Rosa, Niterói, RJ, Brasil.*

²*Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, Porto, Portugal.
thel34@gmail.com*

1. INTRODUCTION

Functional foods can combine food with herbal medicines. These herbal products are widely used in dietary supplements, daily foods and functional foods, for health promotion purposes. The concept is connected with immuno-potential, the improvement of system circulation, disease prevention, and aging control [1].

The best-known group of products available for health promotion purposes are the probiotics, consumed to maintain or improve gut health, and they act by several mechanisms.

These mechanisms involve the maintenance of a barrier against colonization by pathogenic bacteria; inhibition of the growth of pathogens (maybe by producing bacteriocins); competition for nutrients with the pathogens and enhancement of the gut immune response by contact and crosstalk with the host via mucosa. Probiotics, defined as “live microorganisms that, when consumed in an adequate amount as part of the food, confer a health benefit on the host”, colonize the gut temporally and they must be consumed regularly. The effects of probiotics can be enhanced by simultaneously providing prebiotics [2].

Prebiotics are non-digestible food ingredients that beneficially affect the host by selectively stimulating the growth and/or activity of one or a limited number of bacteria in the colon [3]. Thus, the prebiotic approach advocates the administration of non-viable entities, and therefore overcomes any viability problems of probiotics in the upper GI system. It differs from the classical dietary fibers in that it selectively stimulates the growth and/or activity of bifidobacterial species in particular. The general term “dietary fibers” refers to the remains of plant cells that are resistant to hydrolysis by human enzymes and that modulate the carbohydrate and lipid metabolism of the host (positive influence on constipation, hyperlipidemias, diabetes, obesity, and diverticular disease). Fiber components are not selectively fermented or are not fermented at all. So, to be classified as a prebiotic, a food ingredient must be neither hydrolyzed nor absorbed in the upper part of the GI system, be able to alter the colonic flora in favor of a healthier composition through selective fermentation and induce luminal or systemic effects that are beneficial to the hosts’ health [4].

The nutritional and physicochemical properties of cereals are very important when they are used as ingredients in functional foods. Adlay (*Coix lachryma-jobi* L.) is a maize related cereal which has gathered a great attention in recent years due to many health-beneficial components reported in its seeds including proteins, polysaccharides, coixenolide, coixol, and lipids [5]. The claimed health benefits include several biological activities like antioxidant, anticarcinogenic, anti-inflammatory, anti-allergy, anti-obesity, antidiabetic, gastric protector, hypolipidemia, immunological enhancing, regulating endocrine functions, and modulating gut microbiota.

Many nutrients play an important role in the maintenance of normal mucosal function in the gut area. There are also age-related changes which could influence nutrient utilization and especially microbiota on the mucosa. Thus, the intestinal microbiota becomes less complex during ageing and the metabolic role of the intestinal microbiota is altered. This may result in poorer utilization of nutrients and reduced detoxification of harmful components in the gut as well as increased risk for intestinal infections [6]. Gut physiology and functions mediate the effects of functional foods in three different ways. First, factors in food induce the gut area responses, which may result in long-term adaptive changes (meal-induced responses). Second, foods or mixtures of food are able to alter the digestive and absorptive functions in manners influencing metabolism. Third, the gut area, through its adaptation to diet, affects risk factors for disease. Functional foods can thus also affect overall health and well-being [7].

Various parts of Adlay fruits including bran, hull, and testa have been described in literature and its health effects evaluated both *in vitro* and *in vivo* studies [8]. The bioactivity of Adlay depends on the varieties as well as the sample preparation methods such as the solvent type. Adlay seed is rich in starch and has similar processing properties of other cereals for food formulation. The fruits of Adlay present different sizes and colors reflecting the genetic diversity. This diversity may also be the basis in the variation of the chemical composition of this species, which remains to be better explored. In such context, the present work aimed the chemical and nutritional analysis of samples of a Brazilian Adlay cultivar (*var. lachryma-jobi*, cultivar Magé, Rio de Janeiro).

2. MATERIAL AND METHODS

Adlay fruits (5 kg) and fruits flour (500g) were kindly supplied by PGEB, UFF, Brazil. A voucher specimen (no. HUNI 4487) has been deposited in the herbarium of the Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO) for future references. After reception, the samples were stored in a fresh and dry place, protected from light.

For the macronutrients analysis, all analytical grade reagents were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The standards were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, USA), except coixol (Biopurify, Chengdu, China). HPLC grade solvents were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was obtained in a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Moisture was determined using an infrared balance (Scaltec model SMO01, Scaltec Instruments, Heiligenstadt, Germany). The remaining nutritional analyses were performed according to AOAC procedures [9]. Briefly, ashes were quantified after incineration at 500°C. Total lipids and protein were determined by the Soxhlet and the Kjeldahl methods, respectively. Fibre was analysed through enzymatic-gravimetric procedures. Non-fibre carbohydrates were calculated by difference.

Total phenolic contents were determined according to the Folin-Ciocalteu method described by Chen *et al.* (2011), with some modifications [10]. Ethanol extracts obtained by cold maceration were diluted in methanol to obtain a 2 mg/mL solution. An aliquot of 200 µL of each sample was mixed with 2 mL of distilled water, 1 mL of Folin-Ciocalteu reagent and 5 mL of 20% sodium carbonate solution. After incubation in the dark for 20 minutes at room temperature, the absorbance was measured in a spectrophotometer at 735 nm. For the blank, the volume of extract was replaced by distilled water. An analytical curve was prepared with methanolic solutions of gallic acid (0.00375 - 0.00875 mg / mL). The

total phenolic content was expressed in milligrams of gallic acid equivalents per gram of extract (mg GAE /g).

The aluminum chloride method (AlCl_3) was used to determine the total flavonoid contents as described by Funari and Ferro (2006) [11]. Five milligrams of each sample of extracts were weighed and transferred to a 25 mL volumetric flask containing 1 mL of 2% AlCl_3 solution and the volume completed with methanol. After 30 minutes incubation under light and at room temperature, the absorbance was measured in a spectrophotometer at 425 nm. For the blank, the volume of 2% AlCl_3 solution was replaced with methanol. The analytical curve was prepared with rutin methanolic solutions (0.002 - 0.012 mg / mL). Total flavonoid content was expressed in milligrams of rutin equivalents per gram of extract (mg RE / g).

The chromatographic quantification of coixol in samples of crude ethanolic extracts, was carried out in HPLC/DAD, according to the validated method described by Zhang *et al.* (2010) [12]. The mobile phase was composed by an isocratic system consisting of acetonitrile: phosphoric acid (25:75) and a Reprosil-Pur Basic C18 column as stationary phase. The injection volume was 10 μL , temperature of 25°C and flow of 1mL/min. Coixol contents in the samples were analyzed using an analytical curve constructed with the coixol standard in concentrations ranging from 0.5 to 0.03125 mg/mL.

All results were expressed as mean \pm standard deviation. The statistical analysis of total phenolics, total flavonoids and coixol contents assay results was performed by ANOVA One Way (analysis of variance, descriptive statistics represented by mean and standard deviation) or Kruskal-Wallis non-parametric test (descriptive statistics represented by median and interquartile range). After ANOVA One Way, the Levene Test was performed to analyze the equivalence of the variances and *post hoc* of Bonferroni and Tukey. For all tests, the significance level adopted was $P \leq 0.05$ (95% confidence interval). Analyzes were performed by the open source software Assistat version 7.7 beta.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The chemical characterization of the ethanolic extracts of fruits flour of Adlay showed high amounts of total phenolics (118.7 \pm 2.1 mg GAE/g) and flavonoids (21.2 \pm 0.5 mg de RE/g). Chen *et al.* (2011) showed that ethanolic extracts from Adlay fruits obtained lower concentrations of total phenolics (19.1 \pm 0.7 mg GAE/g) when compared to those found in ethanolic extracts of the fruits analyzed in the present study [10]. The authors obtained very similar results of total flavonoid contents (13.7 \pm 1.8 mg CE/g) to those found in the ethanolic extracts analyzed in the present study.

The accumulation of phenolics in plant tissues is directly related to plant environmental stress, caused by both biotic and abiotic factors, such as allelopathy, nutritional deficiency, variations in temperature, shade or exposure to excessive light, biological stress caused by herbivores and diseases caused by fungi, bacteria and virus [13]. In addition to environmental stress and geographic differences such as climate, physical and chemical characteristics of the soil and amount of water, differences in total phenolic and flavonoid contents may be associated with the treatments of the samples, such as heating and peeling of the fruits, techniques and solvents used for the extraction and the methodology used for the quantification of substances [14,15,16]. In this context, quality in ground preparation, planting, cultural tracts, harvesting and also use of pharmacopoeia methods for extraction and pharmaceutical preparations should be used for the best practices aiming standardization for herbal medicines.

Contents of coixol found in ethanolic extracts were 21.3 \pm 5.4mg/g. Choi *et al.* (1999) reported lower contents of coixol (0.846 mg/g) in aqueous extracts of *C. lacryma-jobi* fruits [17]. The results found by Chung *et al.* (2010) for ethanolic extracts of the same fruits were close to those obtained for the fruits analyzed in the present study, with concentrations of approximately 13.6 mg/g [18]. The quantitative differences between coixol contents showed in the present and previous studies, which also used HPLC-DAD

for quantification, may be related to the environmental conditions that gave rise to plant materials, the processing of these materials, type of extracts obtained, and plant organs used [17,18].

Macronutrients analysis showed that Adlay contains high amounts of dietary fiber (55.3% insoluble and 1.1% soluble), total proteins (7.8%), carbohydrates (20.3%), ash (9.4%), and low amounts of fatty acids (2.2%). Our results disagree with those published by Wu et al. (2007) who found amounts of crude fiber ranging from 1.8 to 2.4%, total proteins (12.1-14.2%), carbohydrates (79.17%), ash (1.6-2.3%), and crude fat (6.3-7.2%) [19]. Those differences may be related to the parts of Adlay fruits used in the analyses, such as whole fruits or only seeds, as described by the authors.

4. CONCLUSION

Adlay is a cereal with a potential for food applications. In view of all the results presented, plants from the State of Rio de Janeiro showed a very high content in fiber, especially insoluble ones, protein and low total amount of fat. Further studies relating the popular use of this species, the presence of active substances and their biological activities must be performed. In addition, future agronomic studies with this species may contribute to the maintenance or enhancement of the chemical and metabolic response of *C. lacryma-jobi* L.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank the financial support to the project Operação NORTE-01-0145-FEDER-000011—called Food Quality and Safety - a (nano) technological approach. This work was also supported by the project UID/QUI/50006/2013 – POCI/01/0145/FEDER/ 007265 with financial support from FCT/MEC through national funds and co-financed by FEDER.

6. REFERENCES

- [1] Al-Sheraji SH., et al. *Journal of Functional Foods* **2013**, 5, 1542- 1553.
- [2] Neef A. and Sanz Y. *Clinical Nutrition* **2013**, 16, 679-687.
- [3] Yadav SA., et al. *EC Nutrition* (**2017**, 7, 61-75.
- [4] Gong L., et al. *Food research International* **2018**, 103, 84-102.
- [5] Xu, L. et al. *Food Chemistry* **2017**, 229, 312-318.
- [6] O'Toole PW. and Jeffery, IB. *Science* **2015**, 350, 1214-1215.
- [7] Schneeman B. *British Journal of Nutrition* **2002**, 88, 159-163.
- [8] F. Zhu. *Trends in Food Science & Technology* **2017**, 61, 160-175.
- [9] AOAC (2012). 19th ed., Arlington VA, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- [10] Chen, H.J, et al. *Food Chem.* **2011**, 126, 1741–1748.
- [11] Funari, C.S. and Ferro, V.O. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2006**, 26, 171-178.
- [12] Zhang, M.C. et al. *Med. Plant.* **2010**, 1, 95–97.
- [13] Cheynier, V. et al. *Plant Physiol. Biochem.* **2013**, 72, 1-20.
- [14] Nagao, T. et al. *Phytochemistry.* **1985**, 24, 2959–2962.
- [15] Karabegović, I.T et al. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, 54, 142–148.
- [16] Wang, L., et al. *Molecules.* **2012**, 17, 8886-8897.
- [17] Choi, C.K., et al. *Korean Soc. Int. Agric.* **1999**, 11, 103–106.
- [18] Chung, C.P., et al. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 7616–7623.
- [19] Wu TT., et al. *Food Chemistry* (**2007**), 104, 1509–1515.

Increased accumulation of anthocyanins in vine stems upon chitosan application: alternate use of winery waste produce to extract natural colour additives for the food industry

Rupesh Kumar Singh^{a}, Fernanda Cosme^a, Ana L. Pinto e Sintra^b, António Inês^a, Virgílio Falco^a and Ana Alexandra Oliveira^b*

^a*Centro de Química de Vila Real (CQ-VR), UTAD, 5000-801, Vila Real, Portugal*

^b*Centro de Investigação e de Tecnologias Agro-Ambientais e Biológicas (CITAB), UTAD, 5000-801 Vila Real, Portugal*

[*rupeshbio702@gmail.com](mailto:rupeshbio702@gmail.com)

Keywords: Anthocyanins; natural colourant; grapevine stems; chitosan

ABSTRACT

Chitosan is a biopolymer and has been used in agriculture for different objectives including improved resistance against fungal pathogens, yield, fruit weight, vegetative growth, quality and shelf-life [1]. In the present work, grapevines from Touriga Franca red grape variety were exposed to 0.01% chitosan aqueous solution during initiation of veraison, after complete veraison and at maturation stage. Vine stems were collected after harvesting of grapes and samples extracted in 50% aqueous ethyl alcohol (v/v) and monomeric anthocyanins were quantified by HPLC. As expected malvidin-3-glucoside was the major anthocyanin recorded with 19.91 ± 0.70 mg/L in control grapevine stems and 43.57 ± 7.70 mg/L (118.83% increased) in chitosan treated grapevine stems. Malvidin-3-coumaroylglucoside was the second major anthocyanin with 11.69 ± 0.38 mg/L in control grapevine stems and 25.11 ± 3.99 mg/L (114.79% increased) in treated grapevine stems followed by peonidin-3-glucoside (5.53 ± 0.20 mg/L in control grapevine stems and 11.00 ± 1.90 mg/L in treated grapevine stems) and malvidin-3-acetylglucoside (5.44 ± 2.48 mg/L in control grapevine stems and 14.96 ± 2.27 mg/L in treated grapevine stems). In addition to these major anthocyanins, 11 other anthocyanins were also detected and quantified, with significant increased accumulation in the treated grapevines.

Anthocyanins are natural colourants with health benefits in dietary context and gaining popularity as a replacement of synthetic colours in food and cosmetic industries with huge market growth forecast up to \$387.4 Million by 2021 [2]. Several synthetic colours are being prohibited and regulated by comprehensive sets of new regulations which is a major limitation for industrial sector; recently EU and USA alleviated the need of natural colours in a variety of products to meet new regulations [3]. The present study suggests application of chitosan to induce anthocyanin accumulation in grapevine stems and use of this winery waste produce to meet the requirement of natural colourants for the food industry.

1. INTRODUCTION

Colourants are added to food and cosmetic products since long time in order to captivate market but there is an increasing demand of natural colourants in place of synthetic ones due to various

issues [4]. Natural anthocyanins have been invigorated as natural colourants not only due to tempting colour hues but also various health promoting properties [2, 5]. Although the synthetic colourants are very economical to produce and carry high stability, consumers demand for natural colourants has been expanding and is expected to boom up to \$387.4 Million by 2021 [2]. In this context, there is an increasing demand for alternative sources of natural anthocyanins among researchers worldwide to meet the industrial as well as legal and ethical requirements [3].

Red grapevines are a major source of natural anthocyanins [4,6] and permitted for food application in European Union (E163) and as extracts in United States [7]. Development of new methods to increase production and extraction of natural anthocyanins is an important area of interest among scientist including metabolic engineering of basic pathway [2] as well as use of elicitor molecule like chitosan to induce secondary metabolite production as defence responses [1]. Present study demonstrates the effect of chitosan exogenous application on red grape (variety Touriga Franca) stems; major waste produce from the winery industry and may be a potential resource for natural anthocyanin as well as promising method for winery waste management towards improved economy for industrial sector.

2. MATERIAL AND METHODS

Vineyards localised at Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal (*Vitis vinifera* L. cv. red grape variety Touriga Franca) were used in the present study. Total of 30 grapevine plants were marked for treatment and 30 grapevine plants for control. Chitosan was prepared as 0.1% (w/v) in 0.01M aqueous acetic acid and sprayed in marked vineyard grapevine plants during initiation of veraison, after complete veraison and maturity stage. Stems were collected after harvesting of grapes, cut in small pieces, lyophilised and grounded in fine powder. Extracts were prepared from 100 mg of each sample in 1.5 mL 50% aqueous ethanol. HPLC-DAD with Ultimate 3000 HPLC system (Dionex Corporation, USA) attached with detector (PDA-100, Dionex Corporation, USA) was used to analyse monomeric anthocyanins. C-18 column (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m particle size) was used and 1 mL/min flow rate was maintained at 35 °C. Operation was carried out between 200-600 nm and the chromatograms were recorded at 525 nm. Calibration curves were obtained with cyanidin-3-glucoside, malvidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside and pelargonidin-3-glucoside. Using the coefficient of molar absorptivity (ϵ) and by extrapolation, it was possible to obtain the slopes for delphinidin-3-glucoside ($\epsilon = 23700 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$), petunidin-3-glucoside ($\epsilon = 18900 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) and malvidin-3-coumaroylglucoside ($\epsilon = 20200 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) to perform the quantification. The results of delphinidin-3-acetylglucoside, petunidin-3-acetylglucoside, peonidin-3-acetylglucoside, cyanidin-3-acetylglucoside and cyanidin-3-coumarylglucoside were expressed as respective glucoside equivalents. All analyses were performed in triplicates.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Total of 15 monomeric anthocyanins were detected and quantified by HPLC, and as expected malvidin-3-glucoside was the most abundant with $19.91 \pm 0.70 \text{ mg/L}$ in control grapevine stems

and 43.57 ± 7.70 mg/L (118.83 % increased) in chitosan treated grapevine plants followed by malvidin-3-coumaroylglucoside with 11.69 ± 0.38 mg/L in control grapevine stems and 25.11 ± 3.99 mg/L (114.79 % increased) in treated grapevine plants. Peonidin-3-glucoside (5.53 ± 0.20 mg/L in control grapevine stems and 11.00 ± 1.90 mg/L in treated grapevine plants) with 98.91 % increase and malvidin-3-acetylglucoside (5.44 ± 2.48 mg/L in control grapevine stems and 14.96 ± 2.27 mg/L in treated grapevine plants) also with a detected increase of 175.00 %. Other identified anthocyanins were in less amount but showed significant increase in treated samples. Delphinidin-3-glucoside (1.50 ± 0.01 mg/L in control grapevine stems and 2.79 ± 0.47 mg/L in treated grapevine plants) showed 86% increase, cyanidin-3-glucoside (1.25 ± 0.01 mg/L in control grapevine stems and 2.38 ± 0.39 mg/L in treated grapevine plants) with 90.39% increase, petunidin-3-glucoside (2.38 ± 0.02 mg/L in control grapevine stems and 4.85 ± 0.80 mg/L in treated grapevine plants) with 103.78% increase, delphinidin-3-acetylglucoside (0.32 ± 0.05 mg/L in control grapevine stems and 0.54 ± 0.06 mg/L in treated grapevine plants) with 68.75% increase, cyanidin-3-acetylglucoside (0.05 ± 0.00 mg/L in control grapevine stems and 0.17 ± 0.06 mg/L in treated grapevine plants) with 240% increase, petunidin-3-acetylglucoside (0.30 ± 0.06 mg/L in control grapevine stems and 0.67 ± 0.11 mg/L in treated grapevine plants) with 123.33% increase, peonidin-3-acetylglucoside (0.71 ± 0.00 mg/L in control grapevine stems and 1.75 ± 0.30 mg/L in treated grapevine plants) with 146.47% increase, delphinidin-3-coumaroyl-glucoside (0.19 ± 0.01 mg/L in control grapevine stems and 0.24 ± 0.06 mg/L in treated grapevine plants) with 26.31% increase, cyanidin-3-coumaroylglucoside (0.59 ± 0.10 mg/L in control grapevine stems and 1.89 ± 0.22 mg/L in treated grapevine plants) with 220.33% increase, petunidin-3-coumaroylglucoside (0.36 ± 0.07 mg/L in control grapevine stems and 0.81 ± 0.11 mg/L in treated grapevine plants) with 125.00% increase, peonidin-3-coumaroylglucoside (0.63 ± 0.03 mg/L in control grapevine stems and 1.44 ± 0.13 mg/L in treated grapevine plants) with 128.57% increase accumulation.

Different methods have been developed by researcher's community to scale up anthocyanins production. Microbial cells have been established by introduction of foreign genes into host to allow better performance [8] and also genetically modified plant cells have been used as suspension cell cultures for increased anthocyanin accumulation [2]. Genetic modification of organisms and plant cells provide good opportunities but also have many legal and ethical limitations. The present study suggests the use of chitosan as elicitor to induce inherent plant pathways to produce more anthocyanins which can be easy alternate to achieve the requirements without altering the genetic base. Chitosan is a natural biopolymer which is easy to produce, safe, sustainable, economical and feasible to apply with additional benefits [1]. Furthermore grapevine stems produced by wine industries can be reused for extraction purposes and to promote sustainable vitiviniculture.

4. CONCLUSIONS

Chitosan can be a potential elicitor molecule to induce the production and accumulation of anthocyanins. This strategy can be incorporated to establish scale up suspension cell culture factories to fulfill various requirements of food industries.

Acknowledgements

PLATAFORMA DE INOVAÇÃO DA VINHA E DO VINHO - INNOVINE&WINE, NORTE-01--0145-FEDER-000038. Postdoctoral research grant to RKS (BPD/UTAD/INNOVINE&WINE/424/2016) is gratefully acknowledged. We also appreciate the financial support provided to the Chemistry Research Unit in Vila Real (PEst-OE/QUI/UI0616/2014) by FCT – Portugal and COMPETE.

References

- [1] M Massimo, C Raffaella, *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7), 996.
- [2] A Ingo, KWV Anders, W Micael, KHPM Anne, R Julia, O Anne, M Stefan, PM Hans, M Cathie, M Andrea, *Metab Eng* 2018, 48, 218–232.
- [3] L Sari, B Maria, K Alexandra, S Raphaela, B Cato, U Franz, *Food Addit Contam*, 2017, 34 (3), 335–355.
- [4] TS Gregory, T Peipei, GM Monica, *Annu. Rev. Food Sci. Technol*, 2017, 8, 261–280.
- [5] D Li, P Wang, Y Luo, M Zhao, F Chen, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 2017, 57, 1729–1741.
- [6] A Anthony, G Vasil, O Joel, P Bobby, T Violeta, Production of anthocyanins in grape cell cultures: a potential source of raw material for pharmaceutical, food, and cosmetic industries. In: Sladonja, B. (Ed.), *The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive*, InTech Open Access Publisher, 2013, pp. 41, <http://dx.doi.org/10.5772/54592>.
- [7] Code Fed, Regul (CFR), 21 CFR Part 70, ColorAdditives, Part 73: ColorAdditives Exempt from Certification Washington, DC, US Food Drug Admin, 2016.
- [8] J Marienhagen, M Bott, *J. Biotechnol*, 2013, 163, 166–178.

Variedade portuguesa de maçã “Bravo de Esmolfe” como fonte de compostos bioativos com propriedades antioxidantes e antibacterianas

Tânia C.S.P. Pires^{a,b}, Maria Inês Dias^a, Lillian Barros^a, Maria José Alves^a, Celestino Santos-Buelga^b, Isabel C.F.R. Ferreira^{a,}*

^aCentro de Investigação de Montanha (CIMO), Bragança, Portugal

^bGrupo de Investigación en Polifenoles (GIP-USAL), Salamanca, España.

[*iferreira@ipb.pt](mailto:iferreira@ipb.pt)

Palavras chave: Bravo de Esmolfe, perfil fenólico, bioatividades.

RESUMO

A maçã *Malus domestica* Borkh é uma das frutas mais consumidas no mundo. Apresenta uma composição variada e equilibrada, moderadamente energética com teores de açúcares e ácidos que lhes conferem um sabor e uma doçura agradáveis. Esta maçã é um produto com Denominação de Origem Protegida (DOP), sendo grande parte da sua produção restrita à região do interior norte de Portugal. O objetivo do presente trabalho foi determinar as suas propriedades bioativas e o perfil fenólico individual no extrato hidrometanólico por HPLC-DAD-ESI/MS. A atividade antioxidante foi avaliada através dos ensaios de efeito captador de radicais livres - DPPH, poder redutor, inibição da descoloração de β -caroteno e inibição da peroxidação lipídica - TBARS. A atividade antimicrobiana foi testada usando o método de microdiluição e o ensaio colorimétrico de cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT) para determinar a concentração mínima inibitória (CMI). Foram identificados quinze compostos fenólicos, sendo os mais abundantes o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (52 mg/100 g de massa seca), seguido de procianidina B2 (35 mg/100 g de massa seca). Os menores valores de EC₅₀ foram obtidos para os ensaios de DPPH e TBARS (EC₅₀ = 0,71 e 0,45 mg/mL, respetivamente). Os extratos mostraram ser efetivos contra todas as estirpes de bactérias Gram-positivo testadas, enquanto que para as bactérias Gram-negativo apenas apresentaram atividade para *Escherichia coli* e *Morganella morganii*. Estes resultados demonstram que a variedade portuguesa de maçã “Bravo de Esmolfe” pode ser utilizada como fonte de compostos bioativos com propriedades antioxidantes e antibacterianas.

1. INTRODUÇÃO

«Bravo de Esmolfe» é uma variedade de maçã portuguesa com um aroma intenso, muito apreciada pelos consumidores, reconhecida como um produto com Denominação de Origem Protegida (DOP), sendo, portanto, um produto com elevado valor acrescentado com impacto na economia local e nacional [1,2]. O consumo regular de frutas e verduras tem sido associado a um risco reduzido de desenvolvimento de doenças crónicas. Esses benefícios são frequentemente atribuídos aos seus elevados níveis de compostos bioativos e poder antioxidante [3]. As maçãs são principalmente constituídas por água (84%), minerais, vitaminas do complexo B, monossacáridos, fibras alimentares e vários compostos bioativos,

como a vitamina C e alguns compostos fenólicos [4–6]. Relativamente à caracterização destes frutos em termos de açúcares, composição em ácidos orgânicos, bem como a determinação de perfil fenólico, existem já vários estudos efetuados por outros autores [5–7]. Contudo, o conhecimento das bioatividades atribuídas a esta variedade de maçã é bastante escasso, tornando este estudo bastante inovador. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar o perfil fenólico da maçã portuguesa da variedade “Bravo de Esmolfe” avaliando também a sua atividade antioxidante e antibacteriana.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras e preparação dos extratos hidrometanólicos

As amostras desidratadas de maçã “Bravo de Esmolfe” (gentilmente cedida pela empresa RBR Foods, Castro Daire, Portugal) foram reduzidas a pó e submetidas a uma maceração com o objetivo de obter um extrato rico em compostos fenólicos. O extrato hidrometanólico foi preparado misturando 1 g da amostra com 30 mL de uma mistura de metanol:água (80:20, v/v), permanecendo em agitação durante 1 h. Posteriormente, a amostra foi filtrada, congelada e liofilizada para posteriores análises.

2.2 Determinação e quantificação de compostos fenólicos

O perfil em compostos fenólicos foi determinado por HPLC-DAD-ESI/MSn. A identificação foi realizada comparando os tempos de retenção nos espectros UV-Vis e de massa, ou então, pela comparação das informações obtidas com dados disponíveis na literatura. A quantificação foi feita a partir das áreas dos picos registados a 280 nm por comparação com as curvas de calibração obtidas dos padrões [8].

2.3 Avaliação das bioatividades

A atividade antioxidante foi determinada por quatro ensaios distintos: efeito captador de radicais livres-DPPH, poder redutor, inibição da descoloração do β - caroteno e inibição da peroxidação lipídica - TBARS, nos extratos hidrometanólicos num intervalo de concentrações de 10 a 0,3125 mg/mL [8].

A avaliação da atividade antibacteriana foi testada nos extratos dissolvidos em água (20 mg/mL) usando o método de microdiluição e o ensaio colorimétrico com cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT) para determinar a concentração mínima inibitória (CMI) [8].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados cromatográficos relativos à identificação de compostos fenólicos nos extratos hidrometanólicos são apresentados na **Tabela 1**. Na **Figura 1** está uma representação cromatográfica do perfil fenólico obtido para o extrato hidrometanólico da maçã “Bravo de Esmolfe”.

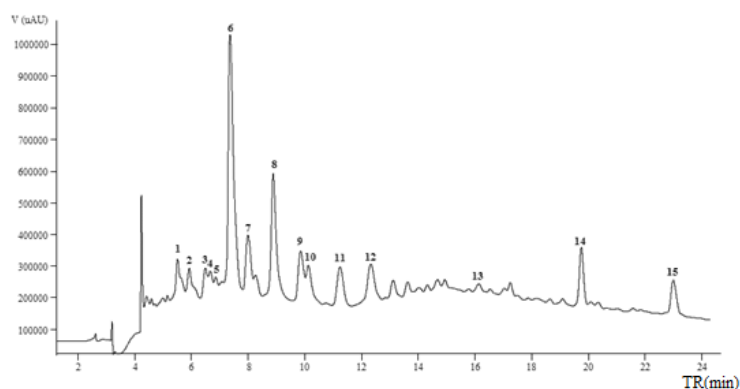
Tabela 1- Tempo de retenção, espectro de absorção máxima, massa, tentativa de identificação e quantificação dos compostos fenólicos na maçã ‘Bravo de Esmolfe’.

| Pico | Tr (min) | λ_{max} (nm) | [M-H] ⁺ (m/z) | Tentativa de identificação | Quantificação (mg/100 g massa seca) |
|-----------------------------------|----------|-----------------------------|--------------------------|--|-------------------------------------|
| 1 | 5,56 | 281 | 577 | Procianidina B1 | 11,38 ± 0,04 |
| 2 | 5,98 | 271 | 373 | Desconhecido | - |
| 3 | 6,54 | 280 | 865 | Trímero de epicatequina tipo B ¹ | 11,3 ± 0,1 |
| 4 | 6,7 | 281 | 865 | Trímero de epicatequina tipo B ¹ | 9,6 ± 0,2 |
| 5 | 6,96 | 322 | 353 | Ácido 4- <i>O</i> -Cafeoilquínico ² | 5,8 ± 0,1 |
| 6 | 7,4 | 327 | 353 | Ácido 5- <i>O</i> -Cafeoilquínico ² | 51,5 ± 0,5 |
| 7 | 8,09 | 280 | 577 | Procianidina B2 | 34,5 ± 0,3 |
| 8 | 8,95 | 311 | 337 | Ácido 4- <i>p</i> -Coumaroilquínico ³ | 14,1 ± 0,6 |
| 9 | 9,96 | 281 | 289 | Epicatequina ¹ | 18,2 ± 0,4 |
| 10 | 10,19 | 312 | 337 | Ácido 5- <i>p</i> -Coumaroilquínico ³ | 6,93 ± 0,04 |
| 11 | 11,34 | 280 | 865 | Procianidina C1 | 19,56 ± 0,01 |
| 12 | 12,42 | 280 | 1153 | Tetrâmero de (C4,C8)-epicatequina ¹ | 24,77 ± 0,01 |
| 13 | 16,2 | 280 | 579 | Biflavonóide desconhecido ¹ | 16,66 ± 0,44 |
| 14 | 19,85 | 285 | 567 | Phloretin-2'- <i>O</i> -xiloglucósido ⁴ | 7,87 ± 0,02 |
| 15 | 23,09 | 285 | 435 | Phlorizin (phloretin-2'- <i>O</i> -glucósido) ⁴ | 4,84 ± 0,01 |
| Compostos fenólicos totais | | | | | 237 ± 1 |

Curvas de calibração a 280 nm: (1) catequina ($y=158.42x+11.38$, $R^2=0.999$); (2) ácido clorogénico ($y=168823x-161172$; $R^2=0.9999$); (3) ácido *p*-cumárico ($y=706.09x+1228.1$, $R^2=0.9989$); (4) isoliquiritigenina ($y=42820x+184902$, $R^2=0.999$).

A principal família de compostos identificados foram os flavan-3-ols, que já tinham sido anteriormente identificados para outras variedades de maçã [7, 9].

Dos quinze compostos fenólicos identificados, o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (pico 6; 51,5 mg/100 g massa seca) foi o composto maioritário, seguido da procianidina B2 (pico 7; 34,5 mg/100 g massa seca).

**Figura 1.** Cromatograma representativo do perfil fenólico da maçã “Bravo de Esmolfe” a 280 nm.

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana são representados na **Tabela 2**. Os valores mais baixos de EC₅₀ foram observados nos ensaios TBARS e DPPH (0,45 e 0,71 mg/mL, respetivamente). A atividade antioxidante de maçãs de outras variedades já foi anteriormente descrita, nomeadamente da Fuji, que apresentou valores mais baixos de EC₅₀ (maior poder antioxidante) para o ensaio DPPH [10]. Relativamente à atividade antibacteriana, os extratos apresentaram CMI mais baixas para as bactérias Gram-

positivo, em particular *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA) (CMI = 2,5 mg/mL). Das bactérias Gram-negativo, *E. coli* e *M. morganii* foram as mais sensíveis com concentrações mínimas inibitórias de 5 mg/mL. Estudos anteriores, utilizando variedades diferentes de maçã, descreveram valores de CMI mais baixos [10], embora seja de realçar que as bactérias utilizadas neste estudo são isolados clínicos multirresistentes.

Tabela 2- Bioatividades do extrato hidrometanólico da maçã “Bravo de Esmolfe”.

| | | |
|---|--|---------------|
| Atividade Antioxidante EC₅₀ (mg/mL) | DPPH | 0,71 ± 0,05 |
| | Poder Redutor | 1,38 ± 0,01 |
| | Inibição da descoloração de β-caroteno | 7,19 ± 0,04 |
| | TBARS | 0,450 ± 0,005 |
| Atividade antibacteriana CMI (mg/mL) | Gram-negativo | |
| | <i>Acinetobacter baumannii</i> | >20 |
| | <i>Escherichia coli</i> | 5 |
| | <i>Escherichia coli</i> ESBL | 5 |
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | >20 |
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL | >20 |
| | <i>Morganella morganii</i> | 5 |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | >20 |
| | Gram-positivo | |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> | 5 |
| | <i>Listeria monocytogenes</i> | 5 |
| | MRSA | 5 |
| | MSSA | 2.5 |

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos a maçã desidratada da variedade “Bravo de Esmolfe”, provou ser uma fonte de compostos bioativos com atividade antioxidante e antibacteriana, podendo no futuro vir a ser utilizada para o desenvolvimento de produtos alimentares de elevado valor acrescentado.

Agradecimentos

FCT (Portugal) e FEDER pelo apoio financeiro ao CIMO (UID/AGR/00690/2013), T.C.S Pires (SFRH/BD/129551/2017) e contrato de L. Barros. À GIP-USAL(AGL2015-64522-C2-2-R) e ao FEDER-Interreg España-Portugal pelo apoio financeiro ao 0377_Iberphenol_6_E.



Referências

- [1] DB Rodriguez-Amaya. Curr. Opin Food Sci 2016, 7, 20–26.
- [2] EUR-Lex - 31996R1107 - PT. J. Of. nº L 148 21/06/1996 p. 0001 - 0010; .
- [3] AT Serra, A A Matias, RFM Frade et al . J Funct Foods 2010, 2, 46–53
- [4] K Rtibi, S Selmi, D Grami, M Amri, B Eto, J El-benna, H Sebai, L Marzouki, Biomed Pharmacother, 2017, 93, 522–528

- [5] J Wu, H Gao, L Zhao, X Liao, F Chen, Z Wang, X Hu, Food Chem, 2007, 103, 88–93
- [6] RP Feliciano, C Antunes, A Ramos, AT Serra et al, Funct Foods, 2010, 2, 35–45
- [7] B Scafuri, A Marabotti, V Carbone, P Minasi, S Dotolo, A Facchiano, sci reports, 2016, 6, 1-12
- [8] TCSP Pires, MI Dias, L Barros, MJ Alves, MBPP Oliveira, C Santos-Buelga, ICFR Ferreira, Food Chem, 2018, 240, 701–706
- [9] M Malec, JM Le Quéré, H Sotin et. al J Agric Food Chem, 2014, 62(29), 6944–6954
- [10] J Luo, P Zhang, S Li, NP Shah, J Food Sci 2016, 81, 1735–1742.

Desenvolvimento de novos produtos alimentares com corantes naturais obtidos a partir de flores comestíveis

Tânia C.S.P. Pires^{a,b}, Maria Inês Dias^a, Lillian Barros^a, João C.M. Barreira^a, Celestino Santos-Buelga^b, Isabel C.F.R. Ferreira^{a,}*

^aCentro de Investigação de Montanha (CIMO), Bragança, Portugal

^bGrupo de Investigación en Polifenoles (GIP-USAL), Salamanca, España.

*iferreira@ipb.pt

Palavras chave: Flores comestíveis, antocianinas, corantes naturais.

RESUMO

A substituição de corantes artificiais por homólogos naturais está entre as principais preocupações dos consumidores atuais, justificando a prospeção de novas fontes desses compostos, nomeadamente flores comestíveis ricas em antocianinas. O objetivo do presente estudo foi desenvolver uma nova estratégia de coloração, utilizando extratos ricos em antocianinas obtidos a partir de flores comestíveis de dália, rosa e centáurea, como alternativas ao E163 (extrato comercial de antocianinas obtido a partir de cenoura). A caracterização antociânica dos extratos aquosos das flores foi realizada por HPLC-DAD-ESI/MS, seguindo-se a incorporação em iogurtes. As formulações foram submetidas à avaliação de parâmetros nutricionais (métodos AOAC), composição em açúcares livres (HPLC-RI) e ácidos gordos (GC-FID), assim como à avaliação da estabilidade cromática das mesmas (conteúdo de antocianinas e parâmetros de cor). Os diferentes parâmetros foram avaliados no dia da preparação (tempo 0) e após 7 dias de armazenamento, comparando-os com duas amostras controlo (sem adição de um agente corante e com a adição de um aditivo natural - E163). Foram identificadas nove antocianinas nos extratos aquosos de dália, duas nos de rosa e oito nos de centáurea, sendo a cianidina, a pelargonidina e a delphinidina as principais aglúconas identificadas. O perfil nutricional foi muito semelhante entre todas as amostras testadas, sendo a humidade o principal componente, seguida de hidratos de carbono, proteínas, gordura e cinza. A lactose e o ácido oleico foram identificados como o açúcar e o ácido gordo maioritários, respetivamente, em todas as amostras. Em geral, os iogurtes preparados com cada extrato de flor, apresentaram um valor nutricional e perfil em açúcares semelhantes aos preparados com E163 e à amostra controlo. Dois extratos naturais destacaram-se apresentando maior potencial como alternativa ao uso de E163, nomeadamente o extrato de rosa, considerando a sua capacidade de coloração (amarelo-laranja), e o extrato de dália, na manutenção da proteção contra a oxidação dos ácidos gordos polinsaturados.

1. INTRODUÇÃO

Entre diferentes produtos lácteos fermentados, os iogurtes são muito apreciados devido às suas propriedades organoléticas e nutricionais. Por serem considerados importantes na dieta humana, são produzidos e consumidos massivamente em muitos países [1,2]. Os corantes são aditivos usados na preparação de algumas formulações de iogurtes e, desta forma, as preocupações recentes sobre a segurança de alguns corantes artificiais em produtos alimentares

encorajou o desenvolvimento e aplicação de alternativas naturais, considerados genericamente mais seguros [3].

As antocianinas são pigmentos hidrossolúveis amplamente encontrados em frutos (especialmente bagas), bem como flores e folhas, principalmente ligados a unidades de açúcar, responsáveis pela coloração de muitos tecidos vegetais na gama de cores azul, roxo e vermelho [4]. Entre as 17 antocianidinas naturais, a cianidina, a delphinidina, a petunidina, a peonidina, a pelargonidina e a malvidina, são as principais formas na maioria das espécies [5]. A cor desempenha um papel importante no desenvolvimento das preferências alimentares e percepção sensorial. No entanto, a cor não é importante apenas no que diz respeito à aparência do produto, pois alguns agentes corantes podem ter outras funções importantes além do seu efeito primário. As antocianinas, por exemplo, podem ter efeitos benéficos para a saúde, devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas e antidiabéticas, sendo, portanto, de grande interesse para a indústria alimentar [6]. Assim, o objetivo do presente estudo foi desenvolver uma nova estratégia de coloração em produtos lácteos (iogurte) usando extratos ricos em antocianinas naturais obtidos a partir de pétalas de flores comestíveis de *Dalia mignon* (mistura comercial), *Centaurea cyanus* L. e *Rosa damascena* "Alexandria" e *Rosa gállica* "Francesa" enxertada em *Rosa canina* L.. Estas flores foram caracterizadas em termos do seu perfil antocinânico utilizando um sistema de HPLC-DAD-ESI/MS. A estabilidade cromática das formulações de iogurte preparadas com os extratos aquosos obtidos a partir das pétalas foi avaliada pelo teor em antocianinas e cor, tendo sido também determinados parâmetros nutricionais, açúcares livres e ácidos gordos em dois momentos diferentes (dia da preparação- tempo 0, e após 7 dias de armazenamento).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras e preparação dos extratos

As amostras desidratadas de pétalas de *Dalia mignon*, *Rosa damascena* 'Alexandria' e *Rosa gallica* 'Francesa' enxertada em *Rosa canina* L., e *Centaurea cyanus* L. (gentilmente cedidas pela empresa RBR Foods, Castro Daire, Portugal) foram reduzidas a pó e submetidas a uma extração por maceração (1 g para 60 mL de água destilada) de forma a obter um extrato rico em antocianinas. A mistura foi filtrada, congelada e liofilizada para posterior análise.

2.2 Identificação e quantificação de compostos antociânicos

Os compostos antociânicos foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detetores de díodos e de espectrometria de massa (HPLC-DAD-ESI/MS). A identificação foi feita comparando os espectros de massa dos compostos obtidos com os padrões disponíveis e com base em informação disponível na literatura [4].

2.3 Processo de incorporação

Foram preparados cinco grupos de iogurtes: iogurtes controlo (sem corante), iogurtes com corante comercial E163 (0,02% *m/v*), iogurtes com extrato de rosa (0,15 % *m/v*), iogurtes com extrato de centaurea (0,10% *m/v*) e iogurtes com extrato de dália (0,05%

m/v). Os corantes foram adicionados a uma porção de 70 g de iogurte que foram preparados em duplicado [4].

2.4 Avaliação da composição nutricional e parâmetros físico-químicos

As amostras foram analisadas quanto à sua composição nutricional seguindo os métodos AOAC (proteínas, gordura, cinzas, hidratos de carbono e energia). Foi determinado o teor em açúcares livres (HPLC-RI) e ácidos gordos (GC-FID). A cor e o pH foram os parâmetros físico-químicos avaliados. Todos os ensaios foram determinados imediatamente após a preparação e após sete dias de armazenamento a uma temperatura de refrigeração, entre 4 e 5 °C .

Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) com somas de quadrados tipo III para comparar os parâmetros avaliados nos iogurtes preparados. Foi também realizada uma análise discriminante linear (LDA) para ter uma melhor compressão do efeito global das formulações de iogurte [4].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados dezanove compostos antocianicos, representados na **Tabela 1**. A cianidina, a pelargonidina e a delfinidina foram identificados como as principais agliconas. Nas amostras de rosa e centáurea a cianidina-3,5-di-*O*-glucósido ($13,19 \pm 0,01$ µg/g extrato) foi identificada com um dos compostos maioritários, tendo sido anteriormente descrita como a principal antocianina em pétalas de outras espécies comestíveis de rosa e centáurea [7,8]. A cianidina-*O*-acetil-hexósido ($5,36 \pm 0,01$ µg/g) foi o composto mais abundante na dália. A cianidina para além de melhorar as características sensoriais do iogurte, pode ser um composto promissor no tratamento da diabetes [9]. Analisando os resultados dos parâmetros nutricionais, o perfil nutricional é muito semelhante em todas as formulações testadas, sendo a humidade (água) o componente principal, seguido de hidratos de carbono, proteínas, gordura e cinzas. A lactose foi o principal açúcar identificado ($\approx 4,8$ g/100 g massa fresca). O perfil em ácidos gordos também foi caracterizado como indicador das condições de conservação. Sendo o leite a principal fonte de ácidos gordos no iogurte era de esperar que a adição dos extratos aquosos não provocasse grandes alterações. No entanto, o ácido oleico em particular ($p = 0,133$), os ácidos gordos saturados ($p = 0,180$) e os ácidos gordos monoinsaturados ($p = 0,125$) foram os únicos casos onde não se observaram diferenças significativas entre as formulações testadas, muito provavelmente porque os extratos podem ter eficácia diferente na prevenção da oxidação de ácidos gordos específicos ao longo do tempo.

Quando analisamos os parâmetros de cor, conseguimos verificar diferenças significativas entre as diferentes formulações de iogurte, surgindo o extrato de rosa, no que diz respeito à sua capacidade de coloração e o extrato de dália, na manutenção da proteção contra a oxidação dos ácidos gordos polinsaturados, como potenciais alternativos ao E163.

Tabela 1- Tempo de retenção (Tr), tentativa de identificação e quantificação das antocianinas presentes nos diferentes extratos (MD \pm DP).

| | Pico | Tr (min) | Tentativa de identificação | Quantificação ($\mu\text{g/g}$) |
|-----------|------|----------|---|--------------------------------------|
| Rosa | 1 | 11,5 | Cianidina-3,5-di- <i>O</i> -glucósido | 13,19 \pm 0,01 |
| | 2 | 18,5 | Cianidina-3- <i>O</i> -glucósido | 0,131 \pm 0,004 |
| | | | Antocianinas totais | 13,326 \pm 0,002 |
| Centáurea | 1 | 11,7 | Cianidina-3,5-di- <i>O</i> -glucósido | 5,5 \pm 0,2 |
| | 3 | 18,03 | Cianidina-3- <i>O</i> -(6''-malonilglucósido)-5- <i>O</i> -glucósido | 6,2 \pm 0,3 |
| | 4 | 20,38 | Cianidin-3- <i>O</i> -(6''-succinilglucósido)-5- <i>O</i> -glucósido | 11,2 \pm 0,5 |
| | 5 | 29,6 | Delfinidina- <i>O</i> -hexósido | 1,5 \pm 0,2 |
| | 6 | 31,5 | Cianidina- <i>O</i> -glucurónido | 0,85 \pm 0,06 |
| | 7 | 32,6 | Delfinidina- <i>O</i> -malonilhexósido | vs |
| | 8 | 38,1 | Pelargonidina 3- <i>O</i> -(6''-succinilglucósido)-5- <i>O</i> -glucósido | 0,18 \pm 0,01 |
| | 9 | 39,2 | Pelargonidina- <i>O</i> -malonilhexósido | 0,17 \pm 0,01 |
| | | | Antocianinas totais | 26 \pm 1 |
| Dália | 10 | 11,6 | Cianidina- <i>O</i> -hexósido | 2,98 \pm 0,01 |
| | 11 | 13,4 | Cianidina- <i>O</i> -hexósido | 2,654 \pm 0,001 |
| | 12 | 15,1 | Pelargonidina- <i>O</i> -rutinósido | 1,4 \pm 0,1 |
| | 13 | 17,2 | Cianidina- <i>O</i> -acetil-hexósido | 5,36 \pm 0,01 |
| | 14 | 19,4 | Metilapigeninidina- <i>O</i> -hexósido | 4,1 \pm 0,1 |
| | 15 | 20,8 | Cianidina- <i>O</i> -rutinósido | 0,8 \pm 0,1 |
| | 16 | 28,5 | Pelargonidina-3,5-di- <i>O</i> -glucósido | 0,8 \pm 0,1 |
| | 17 | 31,5 | Cianidina- <i>O</i> -acetilhexósido | 0,33 \pm 0,02 |
| | 18 | 32,7 | Pelargonidina- <i>O</i> -hexósido | 0,450 \pm 0,001 |
| | | | Antocianinas Totais | 18,8 \pm 0,2 |

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados descritos anteriormente, os extratos naturais com maior potencial como alternativa ao E163 foram o extrato de rosa e o extrato de dália, tornando-se fontes naturais com interesse para a indústria alimentar e farmacêutica.

Agradecimentos

FCT (Portugal) e FEDER pelo apoio financeiro ao CIMO (UID/AGR/00690/2013), T.C.S.P. Pires (SFRH/BD/129551/2017) e contratos de J.C.M. Barreira e L. Barros. GIP-USAL (AGL2015-64522-C2-2-R) e ao FEDER-Interreg España-Portugal pelo apoio financeiro ao 0377_Iberphenol_6_E.



Referências

- [1] C Caleja, L Barros, AL Antonio, M Carocho, MBPP Oliveira, ICFR Ferreira, Food Chem, 2016, 210, 262–268
- [2] F Arioui, D Ait Saada, A Cheriguene, Food Sci Nutr 2017, 5, 358–364
- [3] M Pop, AX Lupea, S Popa, C Gruescu, Extracts, 2010, 13, 771–777
- [4] TCSP Pires, MI Dias, L Barros, JCM Barreira, C Santos-Buelga, ICFR Ferreira, Lwt, 2018, 97, 668–675
- [5] GI Hidalgo, MP Almajano, antioxidants, 2017, 6,7, 1-27
- [6] DB Rodriguez-Amaya, OP-In, 2016, 7, 20
- [7] JH Lee, HJ Lee, MG Choung, Food Chem, 2011, 129, 272–278
- [8] T Mishio, K Takeda, T Iwashina, Nat Prod Commun. 2015, 10 (3), 447-450
- [9] T Suantawee, H Cheng, S Adisakwattana, Int J Biol Macromol, 2016, 93, 814-821.

Chemical features of green fig pulp and peel: phenolic, organic acids, and tocopherols profile

Luís Palmeira^a, Carla Pereira^a, Maria Inês Dias^a, Lillian Barros^{a,*}, Isabel C.F.R. Ferreira^a

^aCentro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal.

* lillian@ipb.pt

Key-words: green fig; phenolic compounds; organic acids; tocopherols

ABSTRACT

The chemical composition of green fig pulp and peel was explored and compared. Among the analysed parameters, the phenolic composition was assessed by HPLC-DAD-ESI/MS, organic acids by HPLC-PDA, and tocopherols by HPLC-fluorescence.

Regarding phenolic compounds, the highest concentration was found in the peel, which revealed the presence of flavonoids and phenolic acids in similar concentrations. On the other hand, the pulp presented a prevalence of phenolic acids.

In terms of organic acids, despite the higher amounts of oxalic and succinic acids found in the pulp, the peel showed higher concentrations of quinic, malic, citric, and total organic acids. The tocopherols profile was similar for both samples, with the four isoforms being detected; α -, β -, and total tocopherols were mostly found in the peels, whereas γ - and δ -tocopherol were prevalent in the pulp.

The results presented highlight the importance of this fruit in human diet, given its richness in nutritional and bioactive compounds that contribute for a balanced and functional diet. Additionally, the chemical composition of fig peel justifies the recovery of this part of the fruit for further application in food industry, in the cases where it is discarded for the preparation of fig-based products.

1. INTRODUCTION

The common fig (*Ficus carica* L.) is one of the first domesticated trees of the Neolithic Revolution. Native to western Asia, this crop was later spread to the Mediterranean region where it is grown for commercial purposes. Its fruits, figs, are widely consumed in the fresh or dried form, or used in the preparation of spirit beverages and jams because of their sweet taste and well-known nutritional properties [1, 2]. In the industrial sector, the fruit peel is often discarded in the preparation of food products that only require the pulp. Nevertheless, this bio-waste (fig peels) has been reported as a good source of phenolic compounds with beneficial effects for human health [3].

Fig is a good source of dietary fibre and contains diverse phytochemicals and vitamins with an important role in human health and nutrition. These compounds have been involved in the prevention of serious health disorders including obesity, diabetes, cardiovascular diseases, neurodegenerative disorders, and even certain types of cancer [4, 5].

The strict legislation for human health and environmental safety, and the emergence of novel methods for recovery of biomolecules have caused great interest in plant-derived waste valorisation. The sustainable use of fig bio-waste for recovery of nutrients and high added-value compounds with potential application in the food, feed, biotechnological, or pharmaceutical industries can thus help to tackle the societal challenges of this century.

This study was performed to characterize and evaluate the differences between the profiles in phenolic compounds, organic acids, and tocopherols of fig pulp and peel.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Samples preparation

Green figs were harvested in September 2017, in a mature state, in Bragança, Portugal. The fresh fruits were washed and its parts were manually separated to obtain pulp and peel. Then, each part was frozen, freeze-dried, and reduced to a fine powder for further analysis.

2.2 Phenolic compounds

Phenolic compounds profile was determined by liquid chromatography (Dionex Ultimate 3000 UPLC, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) coupled to a diode array detector, and a mass spectrometer in negative mode, equipped with an ESI source (Linear Ion Trap LTQ XL mass spectrometer, Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) [6]. The identification was realized by comparing the retention time, UV-vis spectra, spectral mass and information obtained in the literature. The quantification was performed in the areas of the peaks recorded at 280 and 370 nm by comparison with standard calibration curves.

2.3 Organic acids

Organic acids were assessed using ultra-fast liquid chromatography coupled to a photodiode array detector (UFLC-DAD) [7]. The analysis was performed using a Shimadzu 20A series UFLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) and the detection was carried out in a DAD, using 215 nm and 245 nm (for ascorbic acid) as preferred wavelengths and controlled by LabSolutions multi LC-DAD software (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). The quantification was performed by area comparison with calibration curves obtained from each standard compound. The results were expressed in mg per 100 g of fresh weight.

2.4 Tocopherols

Tocopherols analysis was performed by high performance liquid chromatography (HPLC; Smartline pump 1000, Knauer, Germany) connected to a FP-2020 fluorescence detector (with excitation at 290 nm and emission at 330 nm, Jasco, Japan) [8]. The separation was accomplished at 35 °C using a normal-phase Polyamide II column (250 × 4.6 mm, 5 µm, YMC Waters, Lisbon, Portugal). The identification was achieved by comparing the relative retention time of sample peaks with standards, and the quantification was made by using the IS (tocol) method. The results were expressed in mg per 100 g of fresh weight.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The phenolic profile of green fig pulp and peel is presented in **Figure 1**. The different parts of the fruit presented distinct profiles, with the peel revealing similar levels of phenolic acids (0.182 ± 0.002 mg/g fw) and flavonoids (0.176 ± 0.001 mg/g fw), while the pulp showed a prevalence of phenolic acids (0.1058 ± 0.0002 mg/g fw). Quercetin-3-*O*-rutinoside (peak 3), 5-*O*-caffeoylquinic acid (peak 1), and vanillic acid malonyl-di-deoxyhexoside (peak 2) were the major compounds detected in the peel (0.1207 ± 0.0002 , 0.067 ± 0.001 , and 0.056 ± 0.001 mg/g fw, respectively), while caffeic acid hexoside (peaks 1' and 2') was the most abundant compound in the pulp (0.125 ± 0.001 mg/g fw). In terms of total phenolic compounds, the peel (0.358 ± 0.004 mg/g fw) was richer than the pulp (0.1058 ± 0.0002 mg/g fw).

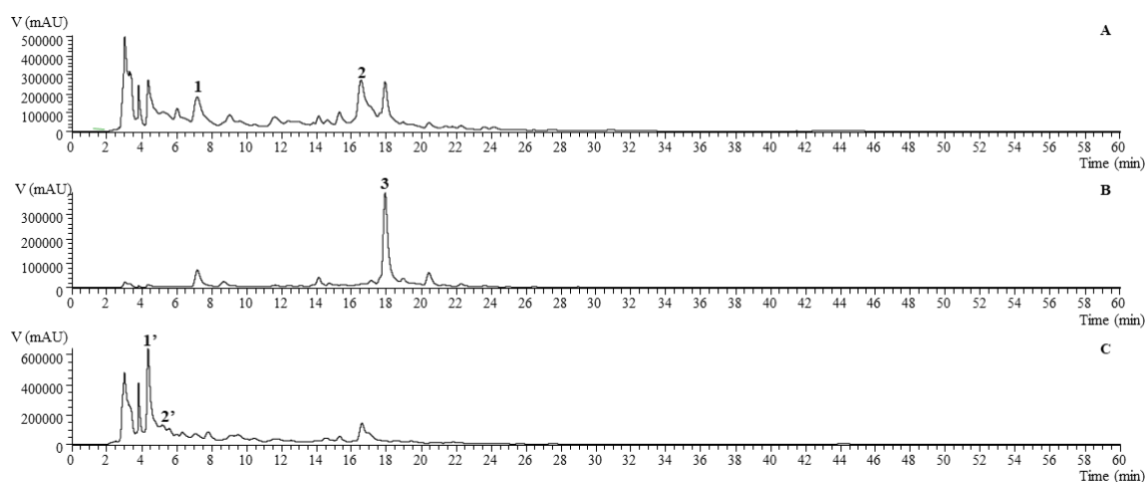


Figure 1. HPLC phenolic profile of green fig peel (**A** and **B**, recorded at 280 and 370 nm, respectively) and pulp (**C**, recorded at 280 nm).

The peel revealed a higher total concentration of organic acids (1580 ± 58 mg/100 g fw), with higher levels of quinic, malic, and citric acids (128 ± 5 , 165 ± 4 , and 827 ± 37 mg/100 g fw) than the pulp. On the other hand, oxalic and succinic acids (228 ± 3 and 484 ± 4 mg/100 g fw) were present in higher concentrations on the fig pulp.

Regarding tocopherols, both parts of the fruit presented the four isoforms, but in different concentrations, with the peel showing a higher total content (4.14 ± 0.04 mg/100 g fw). This sample was richer in α -, β -tocopherol (2.75 ± 0.06 and 0.0157 ± 0.0004 mg/100 g fw), whereas γ - and δ -tocopherol were mostly found in the pulp.

4. CONCLUSIONS

The results obtained in the present study corroborate the importance of studying different parts of fruits as sources of distinct bioactive compounds, especially in the cases where some of the fruit constituents are discarded along foodstuff production chain. Fig peel, which is often a bio-waste, proved to be a valuable source of phenolic compounds, organic acids, and tocopherols, presenting even higher concentrations than the so appreciated pulp, thus justifying its recovery and exploitation.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Foundation for Science and Technology (FCT, Portugal) and FEDER under Programme PT2020 for financial support to CIMO (UID/AGR/00690/2013), C. Pereira grant (SFRH/BPD/122650/2016), and L. Barros contract. To FEDER-Interreg España-Portugal programme for financial support through project 0377_Iberphenol_6_E.

References

- [1] ME Kislev, A Hartmann, O Bar-Yosef, *Science*, 2006, 312, 1372-1374.
- [2] S Sedaghat, M Rahemi, *Sci Horti*, 2018, 237, 44-50.
- [3] E Backes, C Pereira, L Barros, MA Prieto, AK Genena, MF Barreiro, ICFR Ferreira, *Food Res Int*, 2018, 113, 197-209.
- [4] S Mawa, K Husain, I Jantan, *Phytochemistry*, 2013, Article ID 974256, 8 pages.
- [5] A Wojdyło, P Nowicka, AA Carbonell-Barrachina, F Hernández, *J Funct Foods*, 2016, 25, 421-432.
- [6] SMF Bessada, JCM Barreira, L Barros, ICFR Ferreira, MBPP Oliveira, *Ind Crop Prod*, 2016, 89, 45-51.
- [7] C Pereira, L Barros, AM Carvalho, ICFR Ferreira, *Food Res Int*, 2011, 44, 2634-2640.
- [8] L Barros, E Pereira, RC Calhelha, M Dueñas, AM Carvalho, C Santos-Buelga, ICFR Ferreira, *J Funct Foods*, 2013, 5, 1732-1740.

Avanços em metodologias investigacionais
Novos métodos amigos do ambiente

Effect of foliar mitigation treatments on Touriga Nacional grape berry quality

Rupesh Kumar Singh^a, Virgílio Falco^a, Marta Nogueira^a, Jessica Afonso^a, Fernanda Cosme^a

^aCentro de Química de Vila Real (CQ-VR), UTAD, 5000-801, Vila Real, Portugal

*rupeshbio702@gmail.com

Keywords: Climate changes; mitigation treatments; phenolic compounds; grape quality.

ABSTRACT

The grapevine physiology is influenced by several factors, such as temperature, precipitation, potential evapotranspiration and sunshine hours. Thus, due to climatic changes, effects in the grapevine physiology and consequently on the grape berry composition and quality have been observed. Therefore, this work aims to study the effect of the foliar mitigation treatment with kaolin and potassium silicate on the grape berry quality, namely on the phenolic and volatile grape berry composition from Touriga Nacional (*Vitis vinifera* L.) grape varieties. The vineyard was located in Vila Nova de Foz Côa, in the Douro Demarcated Region, north of Portugal. The grapes were harvested at technological maturity. The results obtained show that the phenolic composition differs significantly between treatments. In general, the amount of total anthocyanins increased in grapes subjected to foliar treatment. There was also a change in the anthocyanin profile compared to the control. It was also studied the influence of the treatments on the free and bound volatile compounds in grapes, and the results show that the amount of glucosyl-glucose in the Touriga Nacional grape variety skin decrease slightly after application of both treatments (potassium silicate and aluminum silicate). This study shows that the composition is distinct among the treatments applied. These results allow the identification of the best treatment to be applied, in order to improve the mitigation effects due to thermal stress.

1. INTRODUCTION

The Douro Demarcated Region is characterized by a typically Mediterranean climate. Climatic changes influenced increasingly the physiology and phenology of the grapevine, as well as the composition of the grapes, and the factors that most affect this crop are solar radiation, temperature, wind, precipitation, humidity and characteristics of the soil. In a climate change scenario changes in solar radiation, temperature and precipitation have led to the development of mitigation strategies, such as foliar exogenous application of kaolin $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$, a radiation-reflecting inert mineral, that has demonstrated to be an effective short-term climate change mitigation strategy for Mediterranean vineyards [1]. Kaolin, a white, inert clay mineral, has been used to reduce heat stress in plants by reflecting infrared radiation [2,3]. Therefore, the aim of this work was to study the effect of the foliar mitigation treatment with kaolin and potassium silicate on the grape berries (Touriga Nacional *Vitis vinifera* L.) phenolic and volatile composition. The vineyard was located in Vila Nova de Foz Côa, in the Douro Demarcated Region, north of Portugal.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Experimental design and grape samples

The field study was carried out in a commercial vineyard of *Vitis vinifera* L. cv. Touriga Nacional in the Douro Demarcated Region in northern Portugal. Touriga Nacional grape variety berries were collected from two control plots, two plots treated with kaolin and two plots treated with potassium silicate in different concentrations, 0.1% and 0.05%. The samples were randomly collected in order to obtain a good sample representation. In this work samples were collected on seven different dates to study the effect of the foliar mitigation treatment with kaolin and potassium silicate on grape berry composition.

2.2 Determination of berry fresh weight and pH in grape juice

Individual berry fresh weight from each treatment was measured. The pH analyses were performed from the already crushed grape pulp. pH was determined by potentiometry.

2.3 Determination of total anthocyanins

Total anthocyanins were only determined in grape skins.

2.4 Determination of grape aroma precursors

The grape aroma were determined by the Sep-Pak Plus C18 solid phase extraction and skins extract (1g/10mL) resulting from the freeze-drying of the skins crusher in a 50% ethanol solution. The content of grape aroma precursors was measured only at the last date before harvesting by the glucosyl-glucose (G-G) method described by Villena et al. [4], which is divided into three stages, extraction of aroma precursors, acid hydrolysis and enzymatic glucose determination.

3. RESULTS AND DISSCUTION

3.1 Grape berry weight

Average grape berry weight values were calculated from each data, thus, an increase in the grape berry weight during maturation was observed as shown in Table 1. Böhm [5] evaluates the berry weight of Touriga Nacional grape variety as small and with an average value between 0.90-1.80g, thus meeting the values obtained by us during this work.

Table 1. Grape berry weight (g) of Touriga Nacional grape berries during maturation.

| | TN C | TN K | TN 0.05 | TN 0.1 |
|--------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 26/07 | 0.675 ± 0.062 ^a | 0.653 ± 0.063 ^a | 0.573 ± 0.044 ^a | 0.540 ± 0.013 ^a |
| 02/08 | 0.729 ± 0.051 ^a | 0.632 ± 0.08 ^a | 0.623 ± 0.14 ^{ab} | 0.590 ± 0.02 ^a |
| 09/08 | 0.806 ± 0.05 ^{ab} | 0.695 ± 0.04 ^a | 0.667 ± 0.11 ^{ab} | 0.618 ± 0.09 ^a |
| 17/08 | 1.004 ± 0.08 ^{bc} | 1.062 ± 0.01 ^b | 0.856 ± 0.12 ^{ab} | 0.962 ± 0.02 ^b |
| 28/08 | 0.991 ± 0.02 ^{bc} | 1.056 ± 0.025 ^b | 0.917 ± 0.035 ^{ab} | 1.043 ± 0.116 ^b |
| 07/09 | 1.248 ± 0.002 ^d | 1.109 ± 0.148 ^b | 1.104 ± 0.207 ^b | 0.937 ± 0.016 ^b |
| 20/09 | 1.193 ± 0.09 ^{cd} | 1.180 ± 0.112 ^b | 1.046 ± 0.129 | 1.090 ± 0.129 ^b |

Means within a column followed by different letter are significantly different (p < 0.05).

3.2 pH

As shown in Table 2 and as expected pH has a gradual increase during maturation. This data are in accordance to that obtained by Oliveira [6] also in a study with Touriga Nacional grape variety in the Douro Demarcated Region.

Table 2. pH of Touriga Nacional grape berries during maturation.

| | TN C | TN K | TN 0.05 | TN 0.1 |
|--------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 26/07 | 2.77 ± 0.02 ^a | 2.79 ± 0.02 ^a | 2.77 ± 0.04 ^a | 2.78 ± 0.04 ^a |
| 02/08 | 2.93 ± 0.09 ^a | 2.84 ± 0.04 ^{ab} | 2.89 ± 0.04 ^{ab} | 2.83 ± 0.01 ^a |
| 09/08 | 3.05 ± 0.00 ^{ab} | 2.97 ± 0.06 ^{abc} | 2.96 ± 0.08 ^{ab} | 3.00 ± 0.06 ^a |
| 17/08 | 3.46 ± 0.00 ^c | 3.22 ± 0.04 ^{bc} | 3.28 ± 0.16 ^{bc} | 3.33 ± 0.03 ^b |
| 28/08 | 3.37 ± 0.16 ^{bc} | 3.35 ± 0.11 ^c | 3.48 ± 0.22 ^c | 3.54 ± 0.04 ^b |
| 07/09 | 3.91 ± 0.16 ^d | 3.89 ± 0.20 ^d | 3.95 ± 0.04 ^d | 4.06 ± 0.12 ^c |
| 20/09 | 4.19 ± 0.08 ^d | 4.07 ± 0.11 ^d | 4.26 ± 0.00 ^d | 4.21 ± 0.09 ^c |

Means within a column followed by different letter are significantly different ($p < 0.05$).

3.3 Total anthocyanins

Anthocyanins are the phenolic compounds present in the grape skins and are responsible for the colour. As shown in Table 3 the application of kaolin doesn't increased the anthocyanins in the grape skin, however after application of silicate a increase was observed.

Table 3. Total anthocyanins in mg/g of Touriga Nacional grape berry.

| | TN C | TN K | TN 0.05% | TN 0.1% |
|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 26/07 | 0.012 ± 0.010 | 0.008 ± 0.003 | 0.008 ± 0.004 | 0.007 ± 0.001 |
| 02/08 | 0.123 ± 0.053 | 0.041 ± 0.026 | 0.073 ± 0.075 | 0.036 ± 0.022 |
| 09/08 | 0.440 ± 0.028 | 0.330 ± 0.142 | 0.291 ± 0.125 | 0.279 ± 0.009 |
| 17/08 | 0.666 ± 0.072 | 1.110 ± 0.068 | 1.068 ± 0.236 | 1.091 ± 0.131 |
| 28/08 | 1.108 ± 0.339 | 1.331 ± 0.122 | 1.528 ± 0.024 | 1.594 ± 0.439 |
| 07/09 | 1.455 ± 0.333 | 1.618 ± 0.179 | 1.954 ± 0.668 | 1.768 ± 0.110 |
| 20/09 | 1.703 ± 0.115 | 1.708 ± 0.141 | 1.816 ± 0.034 | 1.844 ± 0.396 |

3.4 Glucosil-Glucose

After a careful analysis to Table3, it is shown that Touriga Nacional grape variety, treated with potassium silicate suffer a small decrease in relation to the control, the same happens with the treatment of aluminium silicate.

Table 3. Glucosyl-glucose in lyophilised skin of Touriga Nacional grape berry.

| Samples | Glucosyl-Glucose in lyophilised skins (µmol/g) |
|---------|--|
| TN 0.05 | 14.5 |
| TN 0.1 | 11.1 |
| TN K | 18.2 |
| TN C | 21.2 |

4. CONCLUSIONS

Results showed that the average weight and the pH of the grape berries is not influenced by the mitigation conditions. In addition, it can also be confirmed that, in the Touriga Nacional grape variety, the amount of glucosyl glucose is influenced by foliar applications. The results obtained are of great interest, since it allows to identify the best treatment to be applied to the vine to protect this crop from the severe droughts and the high sun exposure that they have suffered in the last years, without affecting the quality of the grape berries and consequently of the resulting wines.

ACKNOWLEDGEMENTS

PLATAFORMA DE INOVAÇÃO DA VINHA E DO VINHO - INNOVINE&WINE, NORTE-01--0145-FEDER-000038 and to Projeto NORTE-01-0145-FEDER000017- INTERACT/VitalityWINE, cofinanciado pelo FEDER/Programa NORTE 2020. Postdoctoral research grant to RKS (BPD/UTAD/INNOVINE&WINE/424/2016) is gratefully acknowledged. We also appreciate the financial support provided to the Research Unit in Vila Real (PEst-OE/QUI/UI0616/2014) by FCT – Portugal and COMPETE.

REFERENCES

- [1] L-T Dinis, S Bernardo, A Luzio, G Pinto, M Meijón, M Pintó-Marijuan, A Cotado, C Correia, J Moutinho-Pereira, J Plant Physiol, 2018, 220, 181.
- [2] D M Glenn, N M Cooley, R R. Walker, P R Clingeleffer, K C Shellie, Hortscience, 2010, 45, 1178–1187.
- [3] D M Glenn, G J Puterka, Horticulture Rev, 2005, 31, 1–44.
- [4] M AVillena, J D Perez, J F Ubeda, E Navascues, A I Briones. Food Chem, 2006, 99, 183–190.
- [5] J Böhm Portugal Vitícola, O Grande Livro das Castas. Lisboa. Chaves Ferreira – Publicações, 2ª Edição, 2007, 110; 123.
- [6] A Oliveira Análise do comportamento vitivinícola da casta Touriga Nacional face a diferentes condições geográficas e culturais na Região Demarcada do Douro. Dissertação de Doutoramento, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2003.

Extração de taninos para a produção de coagulantes naturais a partir de acácia (*Acacia dealbata*) e pinheiro (*Pinus pinaster*)

Carina Lopes^a, Ana C. Rodrigues^a, Élia Fernandes^a, Maria Vaz Velho^a e Preciosa Pires^{a,*}

^a Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Portugal

* ppires@estg.ipv.pt

Palavras chave: Coagulação; Extração; Atividade Antioxidante, Taninos.

RESUMO

A coagulação é um processo fundamental no tratamento da água para consumo humano. Nas estações de tratamento de água (ETA), utilizam-se coagulantes químicos, mais concretamente sais metálicos, como o sulfato de alumínio, que permitem neutralizar as cargas elétricas das partículas suspensas na água, facilitando a sua aglomeração e posterior separação. Este processo gera elevadas quantidades de lamas que, por constituírem uma preocupação ambiental, conduziram à procura de alternativas mais seguras e naturais [1]. Os polifenóis, em particular os derivados de taninos condensados provenientes de biomassa vegetal, têm sido objeto de estudo pois, além de possuírem um mecanismo de ação semelhante ao dos coagulantes químicos, os flocos resultantes do processo podem ser utilizados como condicionadores/fertilizantes orgânicos de solos [2]. Neste contexto, o presente trabalho teve como principal objetivo estudar as condições de extração da fração polifenólica da casca de pinheiro (*Pinus pinaster*) e da casca e madeira da acácia (*Acacia dealbata*) e quantificar os taninos nestes extratos tendo em vista a produção de coagulantes naturais para o tratamento de águas. Nos extratos obtidos verificou-se que a casca de pinheiro possui um rendimento de extração e uma atividade antioxidante mais elevada comparativamente à madeira e casca de acácia. Verificou-se ainda que o extrato obtido a partir de madeira de acácia possui um teor de taninos condensados ($89,90 \pm 5,39$ mg/g de matéria seca) mais elevado do que o obtido com a casca da mesma espécie ($56,48 \pm 25,18$ mg/g de matéria seca) indiciando, portanto, um maior potencial para produção de coagulantes naturais.

1. INTRODUÇÃO

A água é essencial para o desenvolvimento socioeconómico e para a manutenção de um ecossistema saudável. O aumento demográfico e as alterações climáticas constituem atualmente uma séria pressão sobre os recursos hídricos, tornando-se urgente promover uma gestão sustentável da água [3]. Nas ETA, a coagulação-floculação é um dos principais processos de tratamento primário da água. Sais metálicos, como sulfato de alumínio e cloreto de ferro, assim como coagulantes pré-hidrolisados, como policloreto de alumínio e policloreto de ferro, têm sido amplamente usados para tratar água e vários efluentes. Embora esses coagulantes proporcionem um ótimo desempenho no tratamento de água, existem algumas desvantagens, como a redução do pH, baixa eficiência do processo a baixas temperaturas e potencial causa de

problemas de saúde quando a água é consumida, elevado custo do coagulante e uma elevada produção de lamas [1].

Devido às desvantagens dos coagulantes químicos, o uso de coagulantes naturais tem recebido um crescente interesse em todo o mundo, por representarem um risco mínimo para a saúde dos organismos vivos, são biodegradáveis, são materiais renováveis por serem obtidos a partir de biomassa e apresentam menor custo. Existem já alguns estudos sobre a produção de coagulantes naturais a partir da cationização de metabólitos secundários polifenólicos presentes principalmente em tecidos moles de plantas superiores, nomeadamente na casca de acácia e pinheiro [4, 5].

Os taninos são um grupo complexo e heterogêneo de metabólitos secundários polifenólicos de plantas superiores, solúveis em água e com peso molecular entre 500 e 20,000 Dalton. Dependendo da sua composição química, os taninos podem ser classificados em dois grupos principais, condensados e hidrolisáveis, sendo que os condensados são os de maior interesse comercial, nomeadamente para o tratamento de água [5].

A cationização de taninos consiste numa reação química que confere caráter catiónico à matriz de tanino orgânico, de modo a que as principais características, solubilidade, estabilidade em diferentes níveis de pH ou atividade quelante de metais pesados, sejam mantidas enquanto outras são adicionadas, em particular, a atividade de coagulação. A reação de Mannich assume extrema importância na transformação do tanino sem carga num tanino catiónico [5].

O presente trabalho teve como principal objetivo estudar as condições de extração da fração polifenólica da casca de pinheiro (*Pinus pinaster*) e da casca e madeira de acácia (*Acacia dealbata*) e quantificar os taninos nestes extratos tendo em vista a produção de coagulantes naturais para o tratamento de águas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Preparação das amostras e caracterização físico-química da matriz

As amostras de casca de pinheiro e de madeira e casca de *Acacia dealbata* foram previamente trituradas e peneiradas para separação da amostra em diferentes granulometrias. A caracterização das amostras foi efetuada com base na determinação da humidade residual segundo a NP 1614-1/2009, teor de cinzas segundo a NP 1615/2002, azoto de Kjeldahl segundo a NP 1612/1979 e extratos lipídicos [6].

2.2. Extração de taninos e determinação do rendimento de extração

As extrações de taninos das amostras de acácia e de pinheiro foram realizadas por dois métodos. Em sistema Soxhlet e por um processo assistido por temperatura num sistema em que a amostra foi misturada com 50 mL de solvente, homogeneizada num Ultra-Turrax a 20,000 rpm durante 1 minuto e foi posteriormente agitada num agitador orbital a 300 rpm durante 3 horas a 40 °C. O solvente utilizado foi com uma mistura água:bioetanol (50:50 v/v), com uma razão solvente/biomassa de aproximadamente 20:1 (v:m). Para a determinação do rendimento de extração, utilizaram-se 25 ml de extrato e colocou-se na estufa a 103°C até obter peso constante.

2.3. Determinação da atividade antioxidante e do teor de taninos

Para a determinação da atividade antioxidante dos extratos, recorreu-se ao método DPPH [7]. O teor de taninos foi determinado segundo o método butanol-HCl [8].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização físico-química das amostras

Na tabela 1 apresentam-se os resultados da caracterização físico-química das amostras de madeira e casca de acácia. Os resultados obtidos indicam que a casca de *Acacia dealbata* apresenta valores superiores para os parâmetros analisados, relativamente aos encontrados na madeira. Estas diferenças podem dever-se ao facto de a casca ser quimicamente mais complexa, uma vez que tem a função de proteger a planta.

Tabela 1. Caracterização da madeira e casca de *Acacia dealbata* (% m/m).

| Amostra | Humidade (%) | Cinzas (%) | Azoto (%) | Extrato lipídico (%) |
|-------------------|--------------|------------|-----------|----------------------|
| Madeira de acácia | 11,00±0,84 | 0,21±0,01 | 0,15±0,01 | 1,29±0,27 |
| Casca de acácia | 15,35±0,13 | 0,55±0,28 | 1,35±0,00 | 2,45±0,20 |

3.2. Rendimento de extração e atividade antioxidante dos extratos

Na tabela 2 apresentam-se os rendimentos de extração das amostras de madeira de acácia e casca de acácia e de pinheiro e a atividade antioxidante dos extratos. Pela análise da tabela 2, não foram observadas diferenças significativas entre amostras de acácia. No método Soxhlet a extração foi mais eficiente na casca de pinheiro quando comparado com a acácia. Verifica-se ainda diferenças significativas entre os dois métodos na extração das casca de pinheiro, o método de Soxhlet é mais eficiente do que o método assistido por temperatura.

Tabela 2. Rendimento de extração atividade antioxidante dos extratos das amostras de acácia e pinheiro.

| Amostra | Rendimento de extração (% m/m) | Atividade antioxidante (μmol de Trolox por g de amostra) |
|--------------------------------------|--------------------------------|--|
| Madeira de acácia (0.2-1.0 mm-Sox.) | 8,32±0,16 ^a | 160,75±6,60 ^a |
| Madeira de acácia (0.18-0.2mm-Sox.) | 5,18±2,15 ^a | 115,02±9,69 ^a |
| Casca de acácia (0.2-1.0 mm-Soxhlet) | 6,30±1,22 ^a | 58,37±18,97 ^a |
| Casca de pinheiro (<0.2mm-Soxhlet) | 34,21±1,90 ^c | 2828,77±214,85 ^c |
| Casca de pinheiro (<0.2mm- 40°C) | 22,79±0,98 ^b | 951,88±2,53 ^b |

Da análise da tabela 2 observa-se que não existem diferenças significativas entre os extratos de acácia no que se refere à atividade antioxidante (DPPH). No entanto, existem diferenças entre

os extratos de acácia e pinheiro, sendo que os extratos de casca de pinheiro possuem maior atividade antioxidante do que os de acácia.

3.3. Quantificação de taninos

Na tabela 3 apresentam-se os resultados da quantificação de taninos condensados na madeira e casca de acácia, verificando-se que não existem diferenças significativas entre as amostras de acácia. Verifica-se ainda que a madeira de menor granulometria, apesar de apresentar o menor rendimento de extração ($5,18 \pm 2,15\%$), apresenta um elevado teor de taninos condensados, levando a concluir que poderá não existir uma correlação direta entre o rendimento de extração e o teor de taninos no extrato, se as condições de extração não forem idênticas.

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão dos taninos condensados na madeira e casca de acácia.

| Amostra | Taninos condensados (mg de matéria seca/g de amostra) |
|----------------------------------|---|
| Madeira de acácia 1 (0,2-1,0 mm) | $89,90 \pm 5,39^a$ |
| Madeira de acácia 2 (0,18-0,2mm) | $80,15 \pm 0,47^a$ |
| Casca de acácia (0,2-1,0 mm) | $56,48 \pm 25,18^a$ |

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitiram concluir que tanto a madeira como a casca de acácia poderão ser um recurso renovável para a produção de coagulantes naturais.

5. REFERÊNCIAS

- [1] H. Kristianto, 2017. The potency of Indonesia native plants as natural coagulant: a mini review. *Water Science and Engineering*, 2, 51-60.
- [2] A. S. Mangrich, M. E. Doumer, A. S. Mallmann, e C. R. Wolf, 2014. Química verde no tratamento de águas: uso de coagulante derivado de tanino de acacia mearnsii. *Rev. Virtual de Química*, 6, 12-15.
- [3] S. M. Mohan, 2014. Use of naturalized coagulants in removing laundry waste surfactant using various unit processes in lab-scale. *Journal of Environmental Management*, 136, 103-111.
- [4] H. A. M. Bacelo, S. C. R. Santos e C. M. S. Botelho, 2016. Tannin-based biosorbents for environmental applications - A review. *Chemical Engineering Journal*, 303, 575-587.
- [5] J. B. Heredia, J. S. Martín, e M. A. D. Acedo, 2011. Optimization of the synthesis of a new coagulant from a tannin extract. *Journal of Hazardous Materials*, 186, 1704-1712.
- [6] S. C. Shoeb Mohammad, 2005. Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkini*. *Tetrahedron*, 61, 9001-9006.
- [7] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier e C. Berset, 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28, 25-30.

FORMAÇÃO PARA A ÁREA ALIMENTAR

Cooperação academia/indústria no desenvolvimento de modelos educacionais

Descodificar os “E”: plataforma online de acesso aberto de aditivos alimentares

Bernardo Lopes^a, Tiago Padrão^a, Márcio Carcho^{a,}, Rui Pedro Lopes^b, Isabel C.F.R. Ferreira^a*

^a Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Portugal

^b Centro de Investigação em Digitalização e Robótica Industrial, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal

* mcarcho@ipb.pt

Palavras chave: aditivos alimentares; números E; aplicação web; plataforma online

RESUMO

Recentemente, a população de países desenvolvidos tem procurado alimentos mais saudáveis, e tem curiosidade em conhecer os seus constituintes e processos de fabrico. Devido a alguma controvérsia na década de noventa e nos inícios do milénio, os aditivos alimentares são ainda olhados com desconfiança pela população, que desconhece grande parte da sua função, origem e segurança. A informação que se encontra na internet é escassa, retalhada, dificilmente acessível ou de fontes pouco fidedignas. Desmistificar e informar a população para os aditivos que são adicionados aos alimentos é uma tarefa que requer um acesso fácil, constante, simples e integrativo, permitindo que o consumidor saiba facilmente aquilo que está a comer. Por outro lado, existem empresas que requerem informações relativas às quantidades legalmente permitidas de aditivos em alimentos, informação essa que está condensada e de difícil acesso na página da European Food Safety Authority (EFSA). Este trabalho apresenta uma solução informática que reúne os dados fundamentais dos aditivos alimentares e das suas possibilidades de utilização num portal *online* de acesso aberto. Esta solução é suportada por uma base de dados relacional que armazena as características mais importantes dos aditivos e das classes a que pertencem, bem como uma lista de categorias alimentares, de modo a especificar os cuidados e as restrições existentes na utilização de certos aditivos em determinadas categorias. Toda esta estrutura facilita a consulta da informação, já que é possível ordenar e filtrar os resultados, relacionando alimentos com aditivos e vice-versa.

1. INTRODUÇÃO

Há alguns anos que os comportamentos alimentares dos consumidores se têm alterado, melhorando consideravelmente os seus hábitos, no que diz respeito à frequência, tipo de alimentação e quantidade. Estudos indicam que os consumidores preferem alimentos não processados e, quando processados, preferem que os aditivos alimentares usados sejam de origem natural. Assim, a par da tendência crescente de consumo de alimentos mais saudáveis, os consumidores têm, também, prestado mais atenção ao que é adicionado aos alimentos que compram. Contudo, a informação disponível acerca de aditivos alimentares encontra-se distribuída por vários locais e em diversas fontes, algumas delas de pouca confiança, e, por vezes, alvo de notícias sensacionalistas, relatando o perigo do seu consumo [1]. É importante,

na medida do possível, reunir, relacionar e confirmar esta informação. Assim, este trabalho detalha a elaboração de uma plataforma de acesso aberto, fácil, rápido, com base na legislação europeia, e de utilização intuitiva, que disponibilize informações úteis acerca dos aditivos e os seus números “E”.

2. DESENVOLVIMENTO

O desenvolvimento da plataforma iniciou com a identificação dos requisitos funcionais e não funcionais do sistema, nomeadamente:

- Recolha, a partir do site da EFSA [2] de toda a informação relacionada com os aditivos alimentares, incluindo a sua classe, categorias alimentares em que são permitidos e respetivas restrições, artigos científicos relevantes e alternativas naturais (no caso dos aditivos de origem sintética);
- Filtração, ordenação e pesquisa dos dados existentes;
- Acesso *online* e *offline* à informação em Português, Inglês e Espanhol;
- Possibilidade de acesso à informação através de várias plataformas com características diferentes.

Estes requisitos são compatíveis com o desenvolvimento multicamada de aplicações (Figura 1). A solução implementada comportou uma arquitetura do tipo cliente-servidor, onde poderão existir múltiplos clientes a aceder ao mesmo tempo. A principal vantagem desta separação é transparência de acesso, permitindo o acesso simultâneo a partir de diferentes plataformas e arquiteturas de sistemas operativos [3].

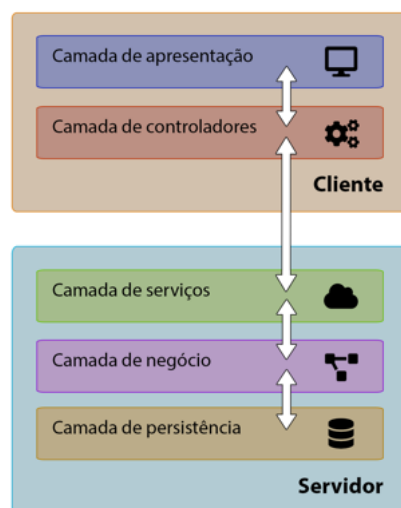


Figura 1 - Arquitetura do sistema.

A arquitetura global estrutura-se em camadas, sendo a de persistência a responsável pelo armazenamento e acesso aos dados. Acima dessa encontra-se a camada de negócio, que contém toda a lógica do sistema, incluindo rotinas que permitem a criação, edição e consulta personalizada dos dados. A esta camada ligam-se os serviços *web* RESTful, que possibilitam o acesso às rotinas por parte de um cliente. No lado do cliente, encontra-se a camada de controladores, responsável por se interligar com o servidor, através da camada de serviços, e

gerir o estado da camada de apresentação. Esta última apresenta a informação aos utilizadores, através de interfaces gráficas ricas e intuitivas.

3. IMPLEMENTAÇÃO E RESULTADOS

Definidos os requisitos do sistema e a arquitetura a adotar, procedeu-se à escolha das tecnologias a utilizar na sua construção. A linguagem *Java* foi utilizada para a programação do servidor, devido à sua robustez e ao facto de ser adequada a sistemas complexos [4]. Utilizou-se uma base de dados relacional na camada de persistência, sendo preenchida com dados preexistentes, obtidos através de um processo de web *crawling* de documentação online em formato HTML, da importação de informação em documentos *pdf* e *doc*, integração da informação constante no *website* da EFSA e informação resultante de pesquisa realizada no CIMO. A nível do cliente, o *framework* responsável pelas camadas de controladores e a apresentação das páginas foi o Apache Wicket. Foram implementadas todas as rotinas e serviços necessários para a criação, consulta, edição e remoção dos dados, bem como para gestão de utilizadores. Esta plataforma contém uma página inicial, com uma caixa de pesquisa e informações pertinentes acerca dos aditivos alimentares, assim como do papel do CIMO na recolha e divulgação dos dados apresentados. A grande mais valia desta plataforma é permitir obter informação rápida e fidedigna acerca de aditivos alimentares, do seu limite máximo de consumo por dia e por alimento, a sua proveniência (natural ou sintética), e caso haja alternativas naturais, essas também serão apresentadas. Por outro lado, permite pesquisar por classes de alimentos, de forma a saber os aditivos que potencialmente podem estar presentes nos alimentos que se consomem dentro da União Europeia. Por fim, permite a pesquisa por número “E”, de modo a desmistificar que aditivos estão por detrás desses números, oferecendo também resultados de bases de dados científicas com publicações científicas relevantes, algumas de acesso aberto. Possui também páginas onde são listados todos os aditivos alimentares (Figura 2), classes de aditivos e categorias alimentares, sendo possível escolher qualquer um destes elementos e ver mais informações sobre eles numa página de detalhes própria. A plataforma tem ainda uma barra de navegação que oferece hiperligações para as diferentes secções disponíveis, um botão de início de sessão, um seletor de idioma (português, inglês e espanhol) e uma caixa de pesquisa. Existe também uma área reservada onde os administradores podem adicionar dados e atualizar a informação existente.

| ID | Nome | Aditivo Classe | Origem | Avaliação |
|------|--|----------------|--------------------|-----------|
| 0100 | Curcuma | Colorante | Natural | Permitido |
| 0101 | Macieira | Colorante | Natural (excluído) | Proibido |
| 0102 | Alfafa | Colorante | Natural | Permitido |
| 0103 | Carotenóides | Colorante | Natural | Permitido |
| 0104 | Extrato de Pimenta Preta (Pimenta Preta) | Colorante | Natural | Permitido |
| 0105 | Extrato de Pimenta Verde (Pimenta Verde) | Colorante | Natural | Permitido |
| 0106 | Extrato de Caramelo | Colorante | Natural | Permitido |
| 0107 | Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0108 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0109 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0110 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0111 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0112 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0113 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0114 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0115 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0116 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0117 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0118 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0119 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0120 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0121 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0122 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0123 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0124 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0125 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0126 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0127 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0128 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0129 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0130 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0131 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0132 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0133 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0134 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0135 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0136 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0137 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0138 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0139 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0140 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0141 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0142 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0143 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0144 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0145 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0146 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0147 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0148 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0149 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0150 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0151 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0152 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0153 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0154 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0155 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0156 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0157 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0158 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0159 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0160 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0161 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0162 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0163 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0164 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0165 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0166 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0167 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0168 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0169 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0170 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0171 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0172 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0173 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0174 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0175 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0176 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0177 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0178 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0179 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0180 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0181 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0182 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0183 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0184 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0185 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0186 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0187 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0188 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0189 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0190 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0191 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0192 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0193 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0194 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0195 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0196 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0197 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0198 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0199 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |
| 0200 | Extrato de Alcornoque | Colorante | Natural | Permitido |

Figura 2 - Interface da plataforma, com destaque para a lista dos aditivos alimentares.

4. CONCLUSÕES

Após uma análise da área, verificou-se que não existe uma plataforma que integre toda a informação acerca de aditivos alimentares e que seja de acesso fácil. A EFSA, responsável pela legislação de aditivos alimentares apenas disponibiliza um documento (*pdf*) de centenas de páginas com a informação pouco acessível. Assim, a missão desta plataforma visa fornecer aos utilizadores informação fidedigna, cientificamente provada e integrada sobre o que são os aditivos alimentares e qual a sua função têm. A informação é apresentada de forma integrada, dispensando a pesquisa em múltiplas fontes, muitas vezes possuindo informação contraditória e potencialmente incorreta. A arquitetura da plataforma permite o acesso através de *browser* de computador ou telemóvel e, no futuro, através de aplicações específicas para plataformas móveis (Android e iOS). Esta plataforma virá a contribuir de forma significativa para a partilha do conhecimento científico com o público em geral.

Agradecimentos

FCT e ao FEDER no âmbito do programa PT2020 pelo apoio financeiro ao CIMO (UID/AGR/00690/2013). Este trabalho foi financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Regional Norte 2020, no âmbito do Projeto NORTE-01-0145-FEDER-023289 (DeCode) e projeto Mobilizador Norte-01-0247-FEDER-024479: ValorNatural. Márcio Carochio agradece à FCT pela bolsa de pós-doutoramento (SFRH/BPD/114650/2016).

Referências

- [1] M Carochio, P Morales, ICFR Ferreira, Trends Food Sci Technol, 45, 2015, 284-295
- [2] Commission Regulation 1129/2011. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32011R1129>
- [3] A Berson, Client/Server Architecture, 1ª ed., 1992, McGraw-Hill: Estados Unidos da América
- [4] BJ Evans, D Flanagan, Java in a Nutshell, 6ª ed., 2014, O'Reilly Media: Estados Unidos da América

Apoios



