



UAlg
UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**Efeito do solvente nas propriedades
antioxidantes e no conteúdo em compostos
fenólicos de extratos de frutos e folhas de
*Rubus***

Dissertação de Mestrado em Engenharia Biológica

Ana Isabel Baltazar Sobral

Faro, Julho de 2012



UAlg
UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**Efeito do solvente nas propriedades
antioxidantes e no conteúdo em compostos
fenólicos de extratos de frutos e folhas de
*Rubus***

Dissertação de Mestrado em Engenharia Biológica

Ana Isabel Baltazar Sobral

Orientador: Professora Doutora Isabel Saraiva de Carvalho

Faro, Julho de 2012

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas e instituições que, de alguma forma, contribuíram, direta ou indiretamente, para o bom desenrolar deste trabalho:

Em primeiro lugar, desejo expressar o meu mais profundo e sincero reconhecimento à Professora Doutora Isabel Saraiva de Carvalho, orientadora desta dissertação, pelo enorme e incansável acompanhamento científico, pelos imprescindíveis ensinamentos, apoios e incentivos constantemente demonstrados, e também por estar sempre presente e disponível não só a nível académico, mas também com a sua amizade, ao longo de todo este trabalho.

Ao Engenheiro Humberto Teixeira, pelos diversos apoios concedidos, nomeadamente no fornecimento dos frutos e folhas estudados.

Ao Coronel José Rosa Pinto, o meu agradecimento pelos ensinamentos e apoios concedidos, e ainda pela simpatia e amizade sempre demonstradas.

À Professora Doutora Maria Manuela David, o meu agradecimento pelos esclarecimentos científicos prestados.

Aos meus colegas de laboratório, Teresa Cavaco, Ana Anastácio, Ricardo Nunes, Rúben Silva, Isabel Baer, Neuton Gorjão, Filipa Ramos e Vânia Correia, pelo apoio, disponibilidade demonstrada, amizade e excelente ambiente de trabalho proporcionado. Um especial agradecimento à Teresa Cavaco pelo valioso contributo que deu para esta tese.

A todos os técnicos dos laboratórios (Edifício 8), o meu agradecimento pelo apoio prestado durante este trabalho.

De entre as entidades que contribuíram para a realização experimental deste trabalho, às quais é extensível o meu reconhecimento, saliento:

- A Hubel Produção Agrícola, pelo fornecimento dos frutos e folhas estudados.
- À Caixa de Crédito Agrícola, pelo apoio concedido.

À minha família e amigos, desejo expressar o meu mais profundo e sincero reconhecimento, pelos diversos momentos e vivências inesquecíveis, por todo o apoio e compreensão sempre manifestados.

Ao Bruno, pelo apoio, paciência e dedicação despendidos em todos os momentos.

A todos aqueles que, em algum momento desta pesquisa, contribuíram para o meu crescimento científico e humano.

“Não me sinto obrigado a acreditar
que o mesmo Deus que nos dotou
de sentidos, razão e intelecto,
pretenda que não os utilizemos.”

Galileu Galilei (1564-1642)

Abreviaturas, siglas e símbolos

AAE – equivalentes de ácido ascórbico

ABTS – 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

ANOVA – análise de variância

AOAC – Associação de química analítica

CE – equivalente de catequina

DAD – *diode array detectors*

DCIP – 2,6 – dicloroindofenol

DPPH – 2,2 difenil-1-picrilidrazila

DNA – ácido desoxirribonucleico

FRAP – poder antioxidante de redução do ferro

GAE – equivalentes de ácido gálico

HCl – ácido clorídrico

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

KCl – cloreto de potássio

QE – equivalentes de quercetina

RP – poder redutor

TAA – atividade antioxidante total

TCA – ácido tricloroacético

TE – equivalentes de trolox

TMA – antocianinas monoméricas totais

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazina

UV – ultravioleta

Abs – absorvência

Lat – latitude

Lon – longitude

min – minutos

Cy 3 – cianidina 3-glucosido
Cy 3,5 – cianidina 3,5-diglucosido
Da – *Dalton*
Dp 3 – delfinidina 3-glucosido
Dp 3,5 – delfinidina 3,5-diglucosido
g – gramas
h – horas
Kcal – quilocaloria
L – litro
M – Molar
mf – massa fresca
mg – miligramas
mL – mililitros
mM – milimolar
ms – massa seca
nm – nanómetro
Pg 3 – pelargonidina 3-glucosido
Pg 3,5 – pelargonidina 3,5 – diglucosido
rpm – rotações por minuto
 μg – microgramas
 μL – microlitro
 μm – micrómetro
 $^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius
 R^2 – coeficiente de correlação
 λ – lambda
% - percentagem

Resumo

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar o efeito do solvente na atividade antioxidante e no conteúdo em compostos fenólicos de extratos aquosos, etanólicos e metanólicos obtidos a partir de frutos e folhas de plantas de *Rubus* cultivadas e não cultivadas (coletadas no campo) obtidas no sul do País.

Nos extratos obtidos de frutos estudados, o espécime RUN2 apresentou os conteúdos em compostos fenólicos (2,57 mg GAE/g amostra fresca) mais elevados (fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas monoméricas totais e taninos condensados) e a maior atividade antioxidante (4,16 mg TE/g amostra fresca). Os extratos aquosos a 95°C e os metanólicos foram o que apresentaram a maior capacidade em extrair estes compostos. Da análise dos resultados dos extratos de folhas de plantas de *Rubus* ressalta que o espécime não cultivado do Algarve (RUN2) apresenta o maior conteúdo em compostos bioativos e a maior atividade antioxidante. Quanto aos diferentes solventes usados nas extrações das folhas, o extrato aquoso (infusão a 95°C) mostrou o maior poder de extração de compostos bioativos (15,09 mg GAE/g amostra seca) e de antioxidantes (34,80 mg TE/g amostra seca).

Na avaliação da atividade antioxidante destes extratos foram realizados vários ensaios. O método ABTS foi, efetivamente, o que apresentou os melhores resultados, indicando que os compostos possuem elevada capacidade para reduzir o radical ABTS^{•+}. O método DPPH mostrou as concentrações mais baixas, sugerindo que os antioxidantes presentes nestes extratos não possuem capacidade para reduzir o radical livre DPPH como possuem para reduzir o radical ABTS^{•+} e/ou ferro (III).

Quanto à avaliação dos perfis de compostos fenólicos individuais (HPLC-DAD) presentes nos extratos, as antocianinas e os ácidos hidroxibenzóicos foram os que apresentaram os teores mais elevados. Assim, a forte correlação existente entre o conteúdo em compostos fenólicos e a atividade antioxidante encontrada nestes frutos ($R^2=0,949$) e folhas ($R^2=0,857$) pode ser explicada pela presença destes compostos maioritários, sugerindo que os fenólicos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante existente nestes extratos.

Conclui-se, então, que as folhas e frutos das plantas estudadas constituem fontes ricas em compostos biologicamente ativos, que possuem importantes propriedades antioxidantes, podendo contribuir significativamente para as exigências das dietas nutricionais e devendo ser fontes de nutrientes complementares a outras fontes principais.

Abstract

The current study had as main objective to evaluate the effect of solvent on the antioxidant capacity and phenolic compound content of aqueous, ethanolic and methanolic extracts obtained from fruits and leaves of wild and cultivated species (*Rubus*) obtained from the south of the country.

In extracts obtained from studied fruits, the specie RUN2 presented the contents in phenolic compounds (2, 57 mg GAE/g fresh sample) the highest (total phenolics, total flavonoids, total monomeric anthocyanins and condensed tannins) and the highest antioxidant capacity (4, 16 mg TE/g fresh sample). The aqueous at 95°C and methanolic extracts presented the greater capacity of extracting these compounds. Analysis of the results of leaves extracts of *Rubus* emphasizes that the wild specie of Algarve (RUN2) has the highest content of bioactive compounds and the highest antioxidant activity. As to the solvents used in the extraction of the leaves, the aqueous extract (infusion at 95°C) showed the greatest power extraction of bioactive compounds (15,09 mg GAE/g dry sample) and antioxidants (34,80 mg TE/g dry sample).

In the evaluation of antioxidant capacity of these extracts, were carried out several assays. The ABTS assay was, effectively the one that showed the best results, indicating that the compounds have a high capability to scavenge ABTS^{•+} radical. The DPPH assay showed the lowest concentration, suggesting that the antioxidants present in the extracts are incapable to scavenging free radical DPPH have as to scavenging the ABTS^{•+} radical and/or reduce iron (III).

On the analysis of profiles of individual phenolic compounds (HPLC-DAD) present in the extracts, the anthocyanins and hydroxybenzoic acids were those with the highest values. Thus, the strong correlation between the content of phenolic compounds and antioxidant capacity found in these species of fruits ($R^2=0,949$) and leaves ($R^2=0,857$) could be explained by the presence of the major compounds, suggesting that the phenolics are mainly responsible for antioxidant activity present in these extracts.

It was concluded that the leaves and fruits of the studied species are rich sources of biologically active compounds that have important antioxidants properties, and may contribute significantly to the requirements of the nutritional diets and should be sources of complementary nutrients to other major sources.

Índice geral

1. Introdução	1
1.1 <i>Rubus</i>	4
1.1.1 Benefícios para a saúde	4
1.1.2 Plantas estudadas	6
1.1.2.1 <i>Rubus ulmifolius</i> Schott	6
1.1.2.2 <i>Rubus idaeus</i> L.	7
1.2 Compostos bioativos (fitoquímicos)	9
1.2.1 Compostos fenólicos	9
1.2.1.1 Antocianinas	11
1.2.1.2 Taninos	12
1.2.1.2.1 Taninos hidrolisáveis	13
1.2.1.2.2 Taninos condensados (proantocianidinas)	14
1.2.2 Ácido ascórbico	16
1.3 Espécies reativas do oxigénio e as alterações oxidativas	17
1.4 Antioxidantes	18
1.4.1 Avaliação da atividade antioxidante	19
1.4.1.1 Método TAA	19
1.4.1.2 Método RP	20
1.4.1.3 Método FRAP	20
1.4.1.4 Método ABTS	20
1.4.1.5 Método DPPH	21
1.5 Objetivos	22
2 Material e métodos	23
2.1 Reagentes	24
2.2 Material vegetal	24
2.3 Preparação dos extratos	25
2.4 Metodologia	26
2.4.1 Caracterização físico-química	26
2.4.1.1 Determinação de sólidos solúveis totais	26
2.4.1.2 Determinação do pH	26
2.4.1.3 Determinação da acidez titulável	26
2.4.1.4 Determinação da cor	26

2.4.1.5	Determinação do teor em humidade	26
2.4.2	Compostos fenólicos	27
2.4.2.1	Determinação do conteúdo em fenólicos totais	27
2.4.2.2	Determinação do conteúdo em flavonoides totais	28
2.4.2.3	Determinação do conteúdo em antocianinas monoméricas totais	28
2.4.2.4	Determinação do conteúdo em taninos condensados	29
2.4.2.5	Identificação de compostos fenólicos por HPLC-DAD	29
2.4.3	Determinação do conteúdo em ácido ascórbico	29
2.4.4	Atividade antioxidante	30
2.4.4.1	Determinação da atividade antioxidante total (TAA)	30
2.4.4.2	Determinação do poder redutor (RP)	30
2.4.4.3	Determinação da atividade antioxidante avaliada pelo método FRAP	31
2.4.4.4	Determinação da atividade antioxidante avaliada pelo método ABTS	31
2.4.4.5	Determinação da atividade antioxidante avaliada pelo método DPPH	31
2.5	Análise estatística	32
3	Resultados e discussão	33
3.1	Influência do solvente na atividade antioxidante e composição físico-química em diferentes extratos de frutos (<i>Rubus</i>)	34
3.1.1	Introdução	34
3.1.2	Resultados e discussão	35
3.1.2.1	Caracterização físico-química dos frutos (<i>Rubus</i>)	35
3.1.2.2	Conteúdo em compostos fenólicos	37
	Conteúdo em fenólicos totais	37
	Conteúdo em flavonoides totais	39
	Conteúdo em antocianinas monoméricas totais	40
	Conteúdo em taninos condensados	41
	Identificação de compostos fenólicos por HPLC-DAD	43
3.1.2.3	Conteúdo em ácido ascórbico	47
3.1.2.4	Atividade antioxidante	48
	Atividade antioxidante total	48
	Poder redutor	49

Atividade antioxidante avaliada pelos métodos FRAP, ABTS e DPPH	51
3.1.2.5 Correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo em fenólicos totais e flavonoides totais	54
3.1.3 Conclusão	58
3.2 Efeito do solvente na atividade antioxidante e conteúdo em compostos fenólicos em diferentes extratos de folhas cultivadas e não cultivadas (<i>Rubus</i>)	60
3.2.1 Introdução	60
3.2.2 Resultados e discussão	61
3.2.2.1 Compostos fenólicos	61
Conteúdo em fenólicos totais	61
Conteúdo em flavonoides totais	62
Conteúdo em antocianinas monoméricas totais	63
Conteúdo em taninos condensados	64
Identificação de compostos fenólicos por HPLC-DAD	67
3.2.2.2 Conteúdo em ácido ascórbico	71
3.2.2.3 Atividade antioxidante	72
Atividade antioxidante total	72
Poder redutor	73
Ensaio FRAP	75
Ensaio ABTS	76
Ensaio DPPH	77
3.2.2.4 Correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo em fenólicos totais e flavonoides totais	79
3.2.3 Conclusão	83
4 Discussão final	84
5 Conclusão final	89
6 Referências bibliográficas	91
7 Anexos	100
8 Apêndices	103

Índice de figuras

Figura 1. Fruto de <i>Rubus ulmifolius</i> Schott	7
Figura 2. Fruto do framboeseiro (<i>Rubus idaeus</i> L.)	8
Figura 3. Estruturas básicas de compostos flavonoides e não flavonoides.	10
Figura 4. Estrutura geral das antocianinas com exemplos de substituintes que originam estruturas químicas de antocianidinas e antocianinas.	12
Figura 5. Estrutura de taninos hidrolisáveis: A) tanino gálico (pentagaloilglucose), B) taninos elágicos (vescalagina e castalagina)	14
Figura 6. Estrutura fundamental dos principais flavan-3-óis (flavonóides) presentes na natureza.	15
Figura 7. Estruturas da (-) -epigalocatequina 3-O-galható (EGCG) e (-) -epicatequina 3-O-galható (ECG)	16
Figura 8. Reação de Fenton. (1) Formação de radicais hidroxilo a partir do peróxido de hidrogénio na presença de ferro reduzido. (2) Regeneração do ferro reduzido pela ação do ácido ascórbico.	17
Figura 9. Estabilização do radical ABTS ^{•+} por um antioxidante e a sua formação pelo persulfato de potássio.	21
Figura 10. Cromatogramas de HPLC-DAD a 310, 326, 348 e 354 nm de compostos fenólicos de RUN2 (<i>Rubus ulmifolius</i> Schott).	46
Figura 11. Correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo em fenólicos totais. A atividade antioxidante foi avaliada pelo método FRAP (A) e pelo método ABTS (B), respetivamente. $R^2 = 0,896$ (A) e $R^2 = 0,824$ (B).	55
Figura 12. Correlação entre a atividade antioxidante avaliada pelos métodos FRAP e ABTS. $R^2=0,784$	56
Figura 13. Cromatograma de HPLC-DAD a 278, 310, 326, 348 e 354 nm de compostos fenólicos de folhas de RUN1 (<i>Rubus ulmifolius</i> Schott).	70
Figura 14. Correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo em fenólicos totais. A atividade antioxidante foi avaliada pelo método ABTS (A) e pelo método RP (B), respetivamente. $R^2 = 0,857$ (A) e $R^2 = 0,863$ (B).	80
Figura 15. Correlação entre a atividade antioxidante avaliada pelos métodos ABTS e RP. $R^2=0,938$.	81

Índice de tabelas

Tabela 1. Plantas estudadas e os seus respetivos códigos.	8
Tabela 2. Parâmetros físico-químicos analisados de plantas cultivadas e não cultivadas de <i>Rubus</i> .	37
Tabela 3. Conteúdo em compostos fenólicos de diferentes extratos de frutos de <i>Rubus</i> .	42
Tabela 4. Concentrações de compostos fenólicos determinados por HPLC de extratos de frutos de <i>Rubus</i> .	45
Tabela 5. Conteúdo em fenólicos totais, ácido ascórbico e atividade antioxidante de extratos de frutos de <i>Rubus</i> .	50
Tabela 6. Atividade antioxidante de extratos de frutos de <i>Rubus</i> , avaliada por três métodos diferentes.	53
Tabela 7. Coeficientes de correlação (R^2) entre os diferentes métodos estudados nos extratos de frutos de <i>Rubus</i> .	57
Tabela 8. Conteúdo em compostos fenólicos de diferentes extratos de folhas de <i>Rubus</i>	66
Tabela 9. Concentrações de compostos fenólicos determinados por HPLC de extratos de folhas de <i>Rubus</i> .	69
Tabela 10. Conteúdo em fenólicos totais, ácido ascórbico e atividade antioxidante de extratos de folhas de <i>Rubus</i> .	74
Tabela 11. Atividade antioxidante de diferentes extratos de folhas de <i>Rubus</i> .	78
Tabela 12. Coeficientes de correlação (R^2) entre os diferentes métodos estudados nos extratos de folhas de <i>Rubus</i> .	82

1. Introdução

A alimentação equilibrada tem um papel importante na manutenção da saúde, existindo uma procura cada vez maior de alimentos que satisfaçam as necessidades nutricionais básicas ou que desempenhem efeitos fisiológicos benéficos na saúde do consumidor (Balogh *et al.*, 2010). Este facto gerou um aumento de esforços da comunidade científica, que tem produzido inúmeros estudos com o intuito de comprovar a atuação de certos alimentos na prevenção de doenças e de conhecer o seu valor nutricional (Oliveira *et al.*, 2009).

Além do seu sabor adocicado e aroma refrescante, os frutos são uma fonte importante de vitaminas, minerais e outros compostos bioativos na dieta humana. O género *Rubus* representa um género diversificado de plantas que habitam principalmente o hemisfério Norte. Tem sido dedicada especial atenção a este género devido à sua alta atividade antioxidante e conteúdo fenólico. Dentro deste género, as espécies *Rubus ulmifolius* Schott e *Rubus idaeus* L., em particular, são conhecidas por demonstrar uma forte atividade antioxidante, principalmente como resultado dos seus altos níveis de compostos fenólicos (Çekiç & Özgen, 2010). Estas espécies são especialmente ricas em taninos (Gudej & Tomczyk, 2004) e contêm uma quantidade notável de compostos flavonoides, nomeadamente canferol e quercetina, ácidos fenólicos, triterpenos, vitamina C, entre outros.

Tal como outras frutas, os frutos vermelhos podem ter benefícios adicionais na saúde, uma vez que são fontes ricas de micronutrientes e fitoquímicos como antocianinas, fenólicos e ácido ascórbico (Çekiç & Özgen, 2010). Os frutos tanto da amoreira-preta como do framboeseiro são muito apreciados dados a sua forma, textura, cor, sabor e aroma que podem apresentar quando consumidos em fresco. Desde sempre que têm sido feitas referências quanto ao seu valor medicinal na cura ou alívio de sintomas de natureza diversa, nomeadamente do foro interno. Atualmente tem aumentado o interesse pelo consumo destes frutos dado os seus elevados teores em fitoquímicos biologicamente ativos capazes de promover a saúde e retardar o aparecimento de incapacidades associadas a doenças crónicas e/ou degenerativas.

As folhas de *Rubus ulmifolius* Schott (amoreira silvestre) são utilizadas por terem efeitos adstringentes, antidiarreicos, pela sua atividade hipoglicémica e como agente antiinflamatório na membrana mucosa da cavidade oral e garganta (Gudej & Tomczyk, 2004). As folhas do framboeseiro (*Rubus idaeus* L.) têm sido comumente utilizadas para tratar uma variedade de doenças, incluindo doenças do tubo digestivo, coração e do sistema cardiovascular. Estas folhas são também conhecidas por terem

benefícios no tratamento da febre, diabetes e dor menstrual. As folhas do framboeseiro podem ainda ser aplicadas externamente como agentes antibacterianos, anti-inflamatórios, sudoríficos e diuréticos. (Gudej & Tomczyk, 2004).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que existe uma correlação entre o consumo de frutas e vegetais e a redução de doenças crónicas (Balogh *et al.*, 2010). A combinação de vitaminas, minerais e antioxidantes fenólicos parece ser responsável por esses efeitos (Kammerer *et al.*, 2007).

Assim, estas plantas (*Rubus ulmifolius* Schott e *Rubus idaeus* L.) vêm despertando o interesse de produtores e consumidores, principalmente pelo potencial de consumo associado às suas propriedades benéficas para a saúde. Portugal apresenta uma diversidade de condições climáticas e pedológicas, que permitem o cultivo destas plantas ao ar livre e, graças aos Invernos amenos da sua orla costeira, em especial no Algarve e Alentejo, é possível a cultura protegida para produção fora de época ao longo do outono, inverno e primavera.

1.1 *Rubus*

O género *Rubus* (família *Rosaceae*), contém aproximadamente 740 espécies, divididas segundo alguns autores, em 12 subgéneros ou segundo outros em 15 subgéneros (Eyduran & Agaoglu, 2011), sendo a sua origem da Europa e América do Norte. Em geral estas plantas têm hastes bianuais, as quais necessitam de um período de dormência antes de frutificar. As flores, normalmente, possuem cinco sépalas e cinco pétalas e numerosos estames e carpelos dispostos ao redor de um receptáculo, geralmente, de forma cónica. Este género apresenta formas de reprodução sexuada e assexuada, possuindo um número básico de cromossomas igual a 7. A ocorrência de poliploidia, agamospermia (formação de sementes sem reprodução sexual) e hibridação entre as espécies, tornam a taxonomia do grupo bastante complicada (Alice & Campbell, 1999). É comum a ocorrência de híbridos interespecíficos com vários graus de esterilidade, os quais se reproduzem assexuadamente por reprodução vegetativa e agamospérmica.

Das espécies de maior interesse agronómico deste género, destacam-se algumas como a *Rubus ulmifolius* Schott e a *Rubus idaeus* L. Este género apresenta características de adaptação climática ampla, podendo encontrar-se cultivares com baixa exigência de horas de frio, até cultivares que exigem 1000 horas de frio para a quebra da dormência das sementes.

1.1.1 Benefícios para a saúde

Vários compostos lipofílicos e hidrofílicos são encontrados em frutas vermelhas, cujas propriedades biológicas têm sido atribuídas aos altos níveis e ampla diversidade de compostos fenólicos. Porém, acredita-se que o efeito complementar, aditivo e/ou, sinérgico resultante dos diversos componentes seja o responsável pelas propriedades biológicas benéficas ao invés de uma única classe ou composto químico (Hirsch, 2011).

A amora-silvestre (*Rubus ulmifolius* Schott) apresenta várias qualidades dietéticas. De entre os diversos efeitos benéficos destacam-se o baixo valor calórico (52 kcal/100g), o teor em sais minerais (potássio, cálcio, magnésio, manganês e ferro), riqueza em vitamina C e fibras alimentares. O ácido ascórbico pode estar presente sob três formas diferentes: ácido ascórbico reduzido (ácido L-ascórbico), ácido monodesidroascórbico e ácido desidroascórbico. A atividade biológica da vitamina C pode perder-se quando o ácido desidroascórbico, por conversão irreversível, se transforma em 2,3 ácido decitogulónico. A amora-silvestre apresenta também como

importantes componentes, os compostos polifenólicos como os taninos. Estes têm um potencial efeito benéfico na saúde humana, incluindo a atividade antioxidante, anti-inflamatória, antiviral e antimicrobiana. O efeito protetor tem sido atribuído à presença de polifenóis, incluindo as antocianinas, proantocianinas, flavonóis e flavonas. As folhas da amoreira-silvestre (*Rubus ulmifolius* Schott) são utilizadas por terem efeitos adstringentes, antidiarreicos, pela sua atividade hipoglicémica e como agente anti-inflamatório na membrana mucosa da cavidade oral e garganta (Gudej & Tomczyk, 2004). As infusões de folhas de *Rubus ulmifolius* Schott possuem propriedades antissépticas urinárias, diuréticas e levemente laxativas. Estudos anteriores realizados em *Rubus ulmifolius* Schott (Panizzi *et al.*, 2002) relataram a presença de flavonoides como a quercetina e o canferol contribuem para prevenir o cancro e diminuir o colesterol.

O framboeseiro (*Rubus idaeus* L.) também contém grande quantidade de antioxidantes. Estudos revelam que uma dieta rica em framboesa foi capaz de reduzir em até 80% a incidência de cancro de cólon. Esta fruta é rica em carboidratos e fibras (pectina) e, portanto é excelente para repor energias. Além disso, cada 100 gramas de framboesa fornecem 57 calorias. Contém alto teor de vitamina C, é antioxidante, substância que retarda o envelhecimento precoce das células humanas. A fruta excita o peristaltismo intestinal de excesso de ácido pela sua grande riqueza em bases. A cura pela framboesa é indicada contra prisão de ventre, reumatismo e outras doenças de fígado, rins e hemorroidas. Usa-se no trato de toda a classe de diarreias, disenterias, cólicas intestinais das crianças, afeções das vias urinárias. Tem propriedades diuréticas e adstringentes. Usa-se contra hidropisia e areia nos rins. As folhas do framboeseiro têm efeito antidiarreico e anti-inflamatório (Gudej & Tomczyk, 2004). Em inflamações das gengivas e de garganta, usam-se as folhas para infusão e fazer enxágue ou gargarejos. As infusões destas folhas têm sido usadas, durante séculos como remédio popular para o tratamento de aftas, herpes labial, caibras nas pernas e náuseas em mulheres grávidas.

1.1.2 Plantas estudadas

1.1.2.1 *Rubus ulmifolius* Schott

A espécie *Rubus ulmifolius* Schott, conhecida comumente por amoreira silvestre, é nativa da Europa e Norte de África. Esta espécie tolera facilmente solos pobres, sendo uma das primeiras plantas a colonizar baldios e terrenos de construção abandonados. Este tipo de arbustos encontra-se com muita frequência associado à vegetação das zonas ribeirinhas (canaviais, caniços), impedindo a erosão destas e preservando a flora aí existente (Cavaco, 2007). A silva cresce em clareiras e orlas de bosques, em matos húmidos, nas bordas de caminhos e de campos de cultivo, em barrancos e margens de rios. É indiferente ao tipo de substrato e prefere um clima temperado quente. Em Portugal, esta espécie ocorre maioritariamente ao sul do Tejo e é um arbusto de porte ereto ou rasteiro, espinhoso, semicaducifólio. É uma das poucas espécies europeias do género que se reproduz sexualmente e é diploide. Algumas das características de identificação são os turiões de cor violeta escuro, com revestimento do tipo ceroso, as folhas alternas compostas por 5 folíolos, brancas tomentosas na página inferior (com pelos estrelados), as estipulas lineares e face superior dos pecíolos sulcada apenas na metade basal e as pétalas lisas, de cor rosada, às vezes brancas. Esta espécie produz drupas em abundância, de cor negra brilhante e sabor ácido ou ácido-doce. No entanto, é uma espécie bastante polimórfica, particularmente nas características como a forma da folha, a ramificação da inflorescência ou a cor das pétalas (Castroviejo *et al.*, 1998). A floração desta espécie é de Maio a Agosto e os frutos são deliciosas amoras silvestres com 10 mm, ocorrendo a sua maturação de Agosto a Novembro.

Esta espécie é conhecida pelas suas propriedades antidiabéticas, adstringentes, depurativas, diuréticas, tónicas, antimicrobianas e antivirais (Dall'Acqua *et al.*, 2008). Estudos anteriores realizados em *Rubus ulmifolius* Schott (Panizzi *et al.*, 2002) relataram a presença de flavonoides como a quercetina e o canferol.



Figura 1. Fruto de *Rubus ulmifolius* Schott. Fotografia cedida por Ricardo Nunes.

1.1.2.2 *Rubus idaeus* L.

O framboeseiro (*Rubus idaeus* L.) é originário da Europa e parte de Ásia, onde cresce de um modo selvagem nos locais frescos. É uma planta arbustiva, com cerca de 40 a 60cm de altura, que cresce originalmente, em locais pedregosos e montanhosos e em terrenos graníticos, prefere zonas com boa luminosidade. Possui um caule subterrâneo, curto, que emite os ramos ou varas anuais com espinhos (acúleos). Estas desenvolvem-se durante o primeiro ano e no ano seguinte florescem e frutificam, morrendo de seguida. No ano seguinte nascerão novas varas. As folhas são compostas imparipinuladas ou alternadas com 3 a 5 folíolos, mais ou menos variáveis de tamanho e de forma, podendo ser ovais, acuminadas, dentadas, de cor verde na página superior e esbranquiçadas ou acinzentadas e pubescentes na página inferior. As flores são brancas, pequenas, suspensas por um pedúnculo largo e espinhoso. O fruto do framboeseiro é de coloração rosa avermelhada ou, raramente, as framboesas são de cor branca, amarela ou roxa. O que denominamos de fruto, é um agregado de 75 a 80 pequenos gomos, convexos, rugosos, agrupados em forma de pinha, onde cada gomo constitui um fruto verdadeiro (Castroviejo *et al.*, 1998) É um fruto naturalmente rico em vitamina C que promove um efeito antioxidante e protetor do sistema imunológico. Além disso, contém minerais como cálcio, potássio, magnésio e ferro, este último muito útil na absorção da vitamina C. Boa fonte de fibras, é também rico em água, o que o torna indicado para casos de obstipação e níveis altos de ácido úrico. Tradicionalmente usa-se na confeção

de doces, gelados, mousses, mas pode optar por saborear-se ao natural. A polpa de framboesa é muito aromática e de sabor agridoce.



Figura 2. Fruto do framboeseiro (*Rubus idaeus* L.). Fotografia de Ana Sobral.

A Tabela 1 apresenta as plantas estudadas neste trabalho, assim como os seus locais de recolha e os respetivos códigos.

Tabela 1. Plantas estudadas e os seus respetivos códigos.

Não Cultivada/Cultivada	Planta	Origem	Código
Não Cultivada	<i>Rubus ulmifolius</i> Schott	F. Alentejo	RUN1
		Lagos	RUN2
Cultivada	<i>Rubus ulmifolius</i> Schott	Faro	RUC
	<i>Rubus idaeus</i> L.	Faro	RIC

1.2 Compostos bioativos (ou fitoquímicos)

Muitos estudos têm mostrado que o consumo de frutas e vegetais pode exercer efeitos positivos sobre a saúde humana. Isto está intimamente relacionado com o facto de que os frutos, reconhecidos por conterem nutrientes essenciais e uma série de micronutrientes tais como minerais, fibras e vitaminas, representarem excelentes fontes dos chamados compostos bioativos. Compostos bioativos são constituintes nutricionais, naturalmente presentes em pequenas quantidades nos alimentos, que exibem uma potente atividade biológica (Jacques & Zambiasi, 2011). Dentre estes, destacam-se os compostos antioxidantes da dieta como os polifenóis, vitaminas C e E e taninos. Estes antioxidantes naturais ocorrem em todas as partes das plantas (Hirsch, 2011).

As atividades biológicas das frutas vermelhas, como a amora-preta e a framboesa, são parcialmente atribuídas ao seu elevado teor de uma variada gama de fitoquímicos como os flavonoides (antocianinas, flavonóis e flavanóis), taninos (proantocianidinas, elagitaninos e galotaninos), estilbenóides (como o resveratrol), ácidos fenólicos (derivados do ácido hidroxibenzóico e hidroxicinâmicos) e lignanas (Seeram, 2006).

1.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático, no qual, pelo menos um hidrogénio é substituído por um grupo hidroxila (Ângelo & Jorge, 2007). Estes compostos químicos pertencem a um grupo heterogéneo com aproximadamente 10 000 compostos (Hermann e Weaver, 1999). Podem ser divididos em dois grandes grupos: os flavonoides, subdivididos em flavonas, flavanóis, flavonóis, flavanonas, isoflavonas e antocianidinas, e os não flavonoides, que compreendem os grupos dos ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos (Figura 3.) (Ângelo & Jorge, 2007).

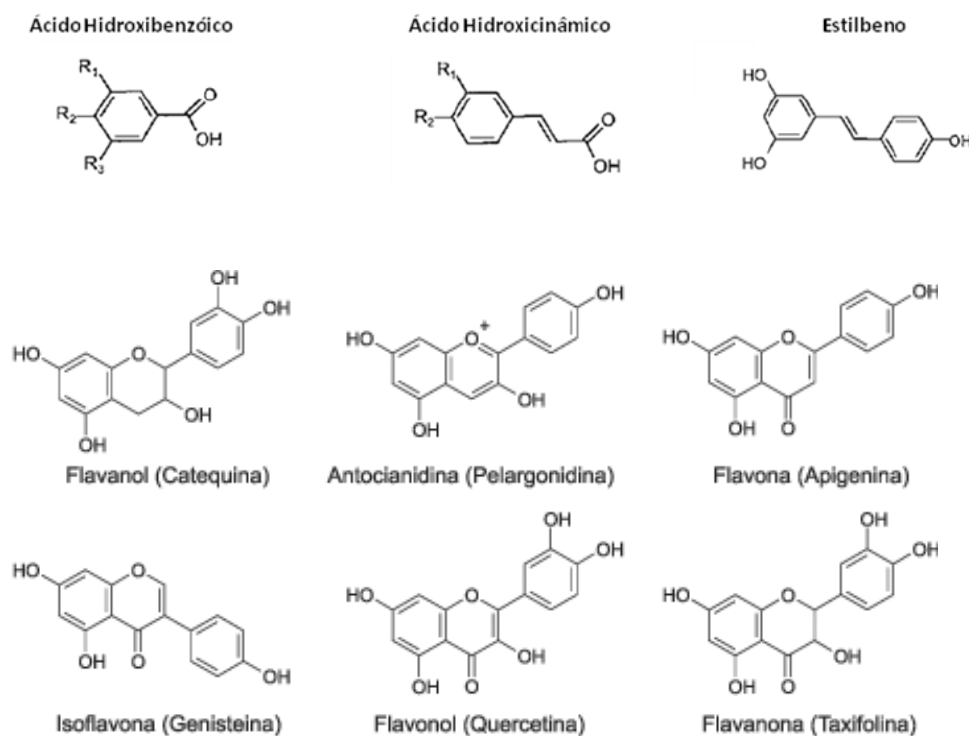


Figura 3. Estruturas básicas de compostos fenólicos flavonoides e não flavonoides. Adaptado de Hirsch, 2011.

Os polifenóis são metabólitos secundários naturalmente presentes em frutas e hortaliças, sendo que as frutas vermelhas, especialmente as frutas de amora-preta e framboesa, são importantes fontes destes compostos na alimentação humana (Zheng & Wang, 2003). Os compostos fenólicos são formados pelas plantas em condições de stress como infecções, ferimentos, exposição a radiações UV, dentre outros (Naczki & Shahidi, 2006), protegendo contra patógenos e predadores.

A importância dos polifenóis na nutrição humana, está geralmente relacionada com a promoção da saúde e possível prevenção de algumas doenças. Dentre os seus efeitos potencialmente benéficos na saúde destacam-se a atividade anti-inflamatória, antiviral, antimicrobiana e antioxidante (Liu, 2003).

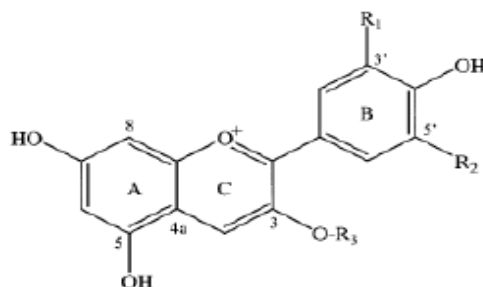
A atividade antioxidante desses compostos é principalmente devido às suas propriedades de oxidação-redução, as quais podem desempenhar um papel importante na absorção e neutralização de radicais livres, removendo o oxigênio tripleto e singleto ou decompondo peróxidos (Amensour *et al.*, 2010). A sua atividade antioxidante está relacionada, também, com a presença de grupos hidroxilo na sua estrutura química e com a alta reatividade dos mesmos, fatores considerados críticos para a neutralização de radicais livres.

Os compostos fenólicos são instáveis podendo sofrer degradação durante as diversas etapas do processamento e armazenamento de alimentos (Ângelo & Jorge, 2007).

1.2.1.1 Antocianinas

As antocianinas são um grupo de compostos fenólicos de ocorrência natural responsáveis pela cor de muitas plantas, flores e frutas (Dégaspari & Waszczyński, 2004). Já as antocianidinas são as agliconas dos compostos encontrados na natureza na forma *O*-glicosilada, e assim chamadas antocianinas (Jacques & Zambiasi, 2011). Há uma variedade enorme de antocianinas espalhadas na natureza e as principais diferenças entre elas são o número de grupos hidroxilos, a natureza e o número de açúcares ligados à sua estrutura, os carboxilatos alifáticos ou aromáticos ligados ao açúcar na molécula e a posição dessas ligações (Figura 4). Até agora, há relatos de mais de 500 antocianinas diferentes e 23 antocianidinas (Hirsch, 2011) das quais seis são as mais comuns nas plantas, sendo elas a pelargonidina, peonidina, cianidina, malvidina, petunidina e delphinidina (Dégaspari & Waszczyński, 2004); as três últimas são as mais comuns na natureza (Hirsch, 2011).

As antocianinas e antocianidinas têm mostrado atividade antioxidante superior às vitaminas C e E. Estes compostos têm capacidade de neutralizar radicais livres por doação de átomos de hidrogênio. Vários estudos têm sugerido que o teor de antocianinas e a sua correspondente atividade antioxidante contribuem para o efeito protetor das frutas e dos legumes contra doenças degenerativas e crônicas (Record *et al.*, 2001). Estes compostos também apresentam vários outros potenciais benefícios para a saúde como a redução do risco de doenças cardiovasculares (Dégaspari & Waszczyński, 2004), a melhora da visão e atividades anticancerígenas e anti-inflamatória (Hirsch, 2011).



ANTOCIANIDINAS E ANTOCIANINAS	R ₁	R ₂	R ₃
Pelargonidina	H	H	H
Cianidina	OH	H	H
Delfinidina	OH	OH	H
Peonidina	OMe	OH	H
Malvidina	OMe	OMe	H
Pelargonidina-3-galactosídeo	H	H	galactose
Cianidina-3-galactosídeo	OH	H	galactose
Cianidina-3-rutinosídeo	OH	OH	rutinose
Cianidina-3-glicosilrutinosídeo	OH	OH	glicose-rutinose
Delfinidina-3-galactosídeo	OH	OH	galactose

Figura 4. Estrutura geral das antocianinas com exemplos de substituintes que originam estruturas químicas de antocianidinas e antocianinas. Adaptado de Hirsch, 2011.

As antocianinas são normalmente estáveis sob condições ácidas, porém podem degradar-se por qualquer mecanismo que leve à formação de compostos escuros e/ou insolúveis. Essa degradação pode ocorrer durante o processamento e/ou armazenamento do alimento, sendo que os fatores de maior influência são o pH, temperatura, presença de oxigênio e enzimas, além da interação com outros componentes do alimento como o ácido ascórbico, íons metálicos, açúcares e co-pigmentos (Nakajima *et al.*, 2004).

1.2.1.2 Taninos

O termo “tanino” foi usado pela primeira vez para descrever o material responsável pela formação de couro a partir de peles animais. A definição fitoquímica de tanino foi proposta em 1962: “*todos os compostos fenólicos solúveis em água, com um peso molecular situado entre 500 e 3000 Da, cujas principais propriedades (para além das reações características dos compostos fenólicos) são a de formarem complexos insolúveis com os alcaloides, gelatina e outras proteínas*” (Bate-Smith & Swain, 1962).

Desde então têm vindo a ser descobertos taninos com pesos moleculares muito elevados na ordem das dezenas de milhares de Dalton (Carvalho, 2007).

A propriedade de precipitar as proteínas, mais particularmente as proteínas salivares presentes na cavidade oral, está na origem das propriedades adstringentes dos alimentos ricos em taninos (McRae & Kennedy, 2011). Classicamente, distinguem-se dois grandes grupos de taninos: os taninos hidrolisáveis e os taninos condensados (Ângelo & Jorge, 2007).

1.2.1.2.1 Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis são, como o nome indica, passíveis de serem degradados por hidrólise química ou enzimática nas várias unidades estruturais que os compõem. São constituídos por uma parte polialcoólica (normalmente a glucose, mas também o ácido quinico, outros fenóis e outros glicósidos) e por uma parte fenólica (e.g. o ácido gálico) ligados através de uma ligação éster (Hagerman, 2010). Os taninos hidrolisáveis podem ser divididos em taninos gálicos (galotaninos), em que a parte fenólica é o ácido gálico, e taninos elágicos (elagitaninos), em que a parte fenólica é o ácido hexahidroxi-difénico (que após a hidrólise origina ácido elágico). A pentagalactoglucose (PGG) e a vescalagina são exemplos de taninos gálicos e elágicos, respetivamente (Figura 5).

Estes taninos são abundantes na classe das dicotiledóneas. Algumas árvores desta classe, como o castanheiro e o carvalho são utilizadas como fontes industriais de tanino. O “ácido tânico”, um nome genérico correspondente a uma mistura de vários taninos gálicos, é extraído de folhas e galhas de arbustos do género *Rhus* (sumagre), das vagens de *Caesalpinia spinosa* (tara) e das galhas de várias espécies de carvalho.

Os taninos gálicos são extremamente raros na nossa dieta e os taninos elágicos encontram-se apenas em grupos restritos de alimentos tais como framboesa, morango, castanha, avelã, caju e pistacho (Carvalho, 2007). Estes taninos foram encontrados em partes não comestíveis de alimentos tais como as folhas das plantas ou, no caso da avelã, na pele, que representa apenas uma pequena parte do total comestível, pelo que o consumo deste tipo de taninos é provavelmente muito baixo. Também se podem encontrar taninos elágicos em vinhos envelhecidos em barricas de madeira de carvalho, como resultado da sua extração da madeira durante o seu estágio em barricas (Clifford & Scalbert, 2000).

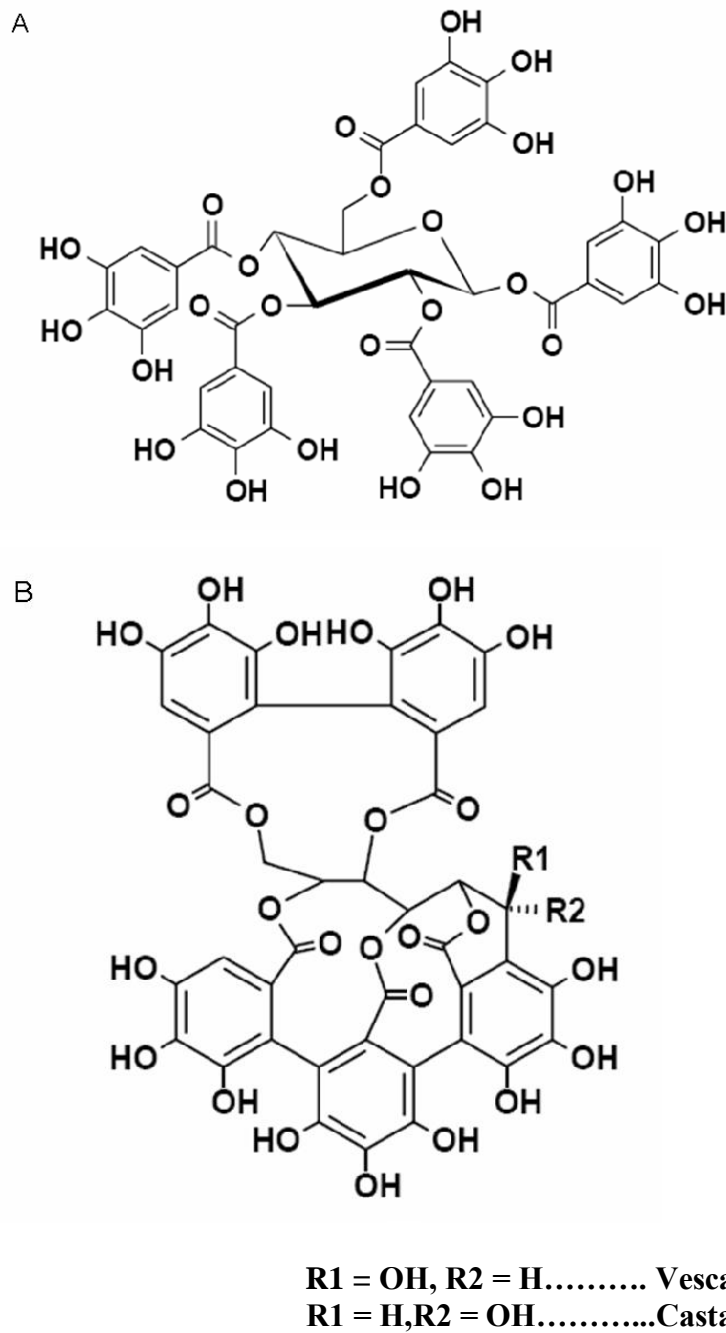
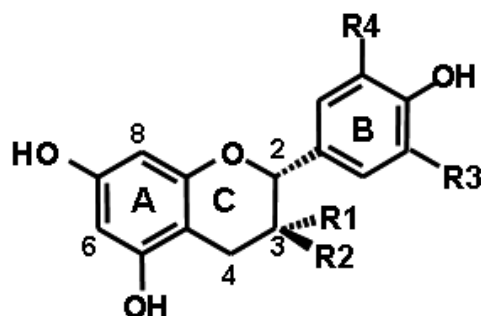


Figura 5. Estrutura de taninos hidrolisáveis: A) tanino gálico (pentagalolilgucose), B) taninos elágicos (vescalagina e castalagina). Adaptado de Hagermen, 2010.

1.2.1.2.2 Taninos condensados (proantocianidinas)

Os taninos condensados são polímeros constituídos por duas ou mais unidades de flavan-3-ol (Figura 6). Quando aquecidos em meio ácido estes compostos originam antocianidinas (reação de Bate-Smith), daí que também sejam conhecidos por proantocianidinas (Cheynier, 2005).

**Afzelequinas:**

R1 = H, R2 = OH, R3 = H, R4 = H.....(+)-afzelequina

R1 = OH, R2 = H, R3 = H, R4 = H(-)-epiafzelequina

Catequinas:

R1 = H, R2 = OH, R3 = H, R4 = OH.....(+)-catequina

R1 = OH, R2 = H, R3 = H, R4 = OH.....(-)-epicatequina

Galhocatequinas

R1 = H, R2 = OH, R3 = OH, R4 = OH.....(+)-galhocatequina

R1 = OH, R2 = H, R3 = OH, R4 = OH.....(-)-epigalhocatequina

Figura 6. Estrutura fundamental dos principais flavan-3-óis (flavonóides) presentes na natureza. Adaptado de Carvalho, 2007.

A estrutura dos principais flavan-3-óis presentes na natureza varia de acordo com o número de grupos hidroxilo no anel B e com a estereoquímica do carbono 3 do heterocíclico C. Assim, dependendo da estereoquímica do carbono 3, podemos ter, por exemplo a (+) -catequina ou a (-) -epicatequina, e dependendo do grau de hidroxilação do anel B podemos ter (epi) afzelequina (monohidroxilado), (epi) catequina (dihidroxilado) ou (epi) galocatequina (trihidroxilado) (Figura 8) (Hagerman, 2002).

Os flavanóis com a configuração 2S, tais como a (-) -catequina e a (+)-epicatequina, são relativamente raros e usa-se o prefixo “ent” (de enantiómero) na sua denominação (entcatequina, e ent-epicatequina, por exemplo). As unidades fundamentais das proantocianidinas estão geralmente ligadas entre si por ligações do tipo C-C entre o C4 de um flavanol e o C8 ou C6 do flavanol seguinte (Hagerman, 2002). O grau de polimerização pode variar, podendo-se encontrar oligómeros (dímeros a hexâmeros) e polímeros (que podem atingir graus de polimerização muito elevados).

As unidades de flavan-3-ol podem ainda estar ligadas a grupos acilo ou glicosilo. O substituinte acilo mais comum é derivado do ácido gálico que forma um éster com o grupo hidroxilo na posição C3 do flavan-3-ol (Figura 7) (Carvalho, 2007).

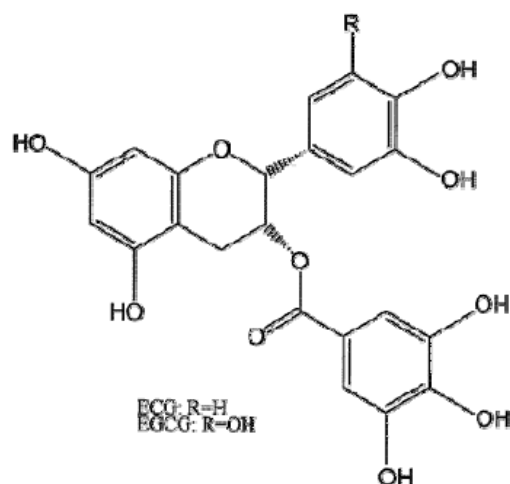


Figura 7. Estruturas da (-) -epigallocatequina 3-O-galato (EGCG) e (-) -epicatequina 3-O-galato (ECG). Adaptado de Carvalho, 2007.

A análise deste tipo de proantocianidinas nos alimentos é difícil devido à enorme variedade de estruturas existentes e à escassez de técnicas analíticas que permitam a sua separação e quantificação. Por esta razão a sua dosagem nos alimentos limita-se às estruturas mais simples como os monómeros, dímeros e alguns trímeros, apesar de os polímeros constituírem a maioria dos polifenóis presentes nas plantas (Carvalho, 2007).

As proantocianidinas são muito mais comuns na dieta do que os taninos hidrolisáveis. Estas estão presentes em concentrações relativamente importantes em frutos, bebidas derivadas, no cacau e chocolate, entre outros (Schmauch *et al.*, 2010).

1.2.2 Ácido ascórbico

O ácido ascórbico está presente em quase todos os alimentos de origem vegetal. É um micronutriente essencial para o homem e a exigência mínima de ácido ascórbico para o ser humano é definida como 40-60 mg/dia. É uma vitamina hidrossolúvel e antioxidante que reage diretamente com o oxigénio simples, radical hidroxilo e radical superóxido, além de regenerar a vitamina E. Além disto, esta vitamina mantém as enzimas sulfídricas nos seus estados reduzidos e poupa a glutathione peroxidase, que é um importante antioxidante intracelular e cofator enzimático (Jacques & Zambiasi, 2011). O ácido ascórbico desempenha várias funções no metabolismo, dentre as quais se destacam o aumento da resistência orgânica e a formação do colagénio, é ativador de crescimento, interfere no metabolismo do ferro, da glicose e na saúde dos dentes e gengivas, além de possuir potente atividade antioxidante. O seu teor é influenciado pelo tipo de solo, forma de cultivo, condições climáticas, procedimentos agrícolas na colheita

e armazenamento (Hirsch, 2011). Além disso, o ácido ascórbico é facilmente destruído por oxidação, particularmente na presença de calor, alcalinidade, catalisadores metálicos, danos físicos e baixa humidade relativa (Santana *et al.*, 2008).

Apesar de ser amplamente conhecido pela atividade antioxidante, em algumas condições o ácido ascórbico pode apresentar características pro-oxidantes, pois após doar os seus dois hidrogénios redutores, fica passível de receber eletrões, devido ao radical ascorbilo formado, que é um agente oxidante (Capecka *et al.*, 2005). Assim, baixas concentrações de ascorbato aumentam a atividade dos radicais de oxigénio, enquanto altas concentrações de ascorbato atuam reduzindo os radicais hidroxilo, oxigénio singlete e peróxidos (Crohns, 2010). A atividade pro-oxidante do ácido ascórbico também foi relatada *in vitro* na presença de traços de metais de transição, como o ferro e/ou cobre. Nestas condições a ação redutora do ácido ascórbico sobre estes metais funciona como um catalisador para a formação de radical hidroxilo através da reação de Fenton (Figura 8; Hirsch, 2011).

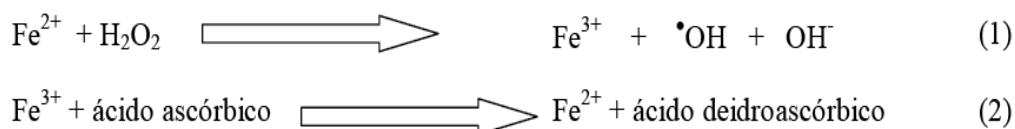


Figura 8. Reação de Fenton. (1) Formação de radicais hidroxilo a partir do peróxido de hidrogénio na presença de ferro reduzido. (2) Regeneração do ferro reduzido pela ação do ácido ascórbico. Adaptado de Ferraz *et al.* (2007) e Hirsch, 2011.

1.3 Espécies reativas do oxigénio e as alterações oxidativas

As espécies reativas de oxigénio são produzidas naturalmente no organismo de mamíferos, como resultado do metabolismo oxidativo. A sua formação ocorre pela ação de enzimas, durante processos fisiológicos (produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes) e pela exposição a fatores exógenos, tais como: ozônio, radiação gama e ultravioleta, dieta, uso de medicamentos e tabagismo. No entanto, são observadas situações nas quais ocorre uma sobrecarga dos mecanismos antioxidantes e o excesso dos radicais livres acumulados apresenta efeitos prejudiciais, pois pode causar danos oxidativos em diferentes moléculas (lípidos, proteínas e ácidos nucleicos) (Barros *et al.*, 2010). O stress oxidativo é definido como o desequilíbrio entre oxidantes e

antioxidantes em favor dos oxidantes, levando potencialmente a danos e tem sido sugerido como causa do envelhecimento e de várias doenças nos seres humanos (Olszewska & Michel, 2009). As espécies reativas do oxigênio estão envolvidas na fase de iniciação de diversas doenças degenerativas, como, por exemplo, danos nas membranas e DNA, propiciando mutações que podem causar carcinogênese, e oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que é considerado um dos principais fatores causadores de doenças cardiovasculares (Hirsch, 2011).

1.4 Antioxidantes

A maioria das espécies animais possui um sistema eficiente de proteção, sendo assim capaz de neutralizar os efeitos prejudiciais decorrentes do metabolismo do oxigênio e da oxidação de lípidos. Para se defender das espécies reativas de oxigênio (EROs), o organismo apresenta mecanismos de defesa em três níveis distintos: prevenção da formação de EROs, eliminação das EROs formadas e reparo de moléculas modificadas pelas EROs. Os compostos antioxidantes atuam na prevenção e eliminação das EROs formadas (Jung *et al.*, 2006)

Os organismos eucariotas possuem enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase que reagem com os compostos oxidantes e protegem as células e os tecidos do stress oxidativo. Estes compostos são conhecidos como antioxidantes enzimáticos (Longhi, 2007).

Participam também no sistema de defesa antioxidante do organismo os chamados antioxidantes não enzimáticos, formados por muitas substâncias como o ácido úrico e proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina (transporte do ferro) e a ceruloplasmina (transporte do cobre e oxidação do ferro para ser captado pela transferrina). Além destes, destacam-se os antioxidantes não-enzimáticos obtidos da dieta, tais como as vitaminas C, E e A, além dos flavonoides e carotenoides, que são extremamente importantes na interceção dos radicais livres. Os antioxidantes não-enzimáticos protegem os alvos biológicos da oxidação por apresentarem capacidade de supressão da formação de radicais livres (quelação de metais ou inibição de enzimas geradoras de radicais livres), eliminação de radicais livres ou desativação formando um produto estável e/ou participação em processos de reparo (Longhi, 2007). As lesões causadas pelos radicais livres nas células podem ser prevenidas ou reduzidas por meio da atividade de antioxidantes, sendo estes encontrados em muitos alimentos.

A defesa inata do corpo humano pode não ser suficiente para neutralizar danos oxidativos (Reynertson *et al.*, 2008), e uma proteção adicional é crítica para a prevenção de doenças. Isto torna os antioxidantes obtidos pela dieta, indispensáveis para a defesa do organismo e manutenção da saúde (Hirsch, 2011).

O crescente conhecimento sobre o impacto gerado por antioxidantes da dieta na promoção da saúde tem levado a um aumento nas investigações no campo de antioxidantes naturais. Os fitoquímicos encontrados naturalmente em frutas e hortaliças apresentam efeitos antioxidantes (Olszewska & Michel, 2009), sendo que muitos destes compostos são encontrados em *R. idaeus* L. e *R. ulmifolius* Schott como os ácidos fenólicos (ácido gálico, hidroxibenzóico, cafeico, cumárico, ferúlico e elágico) e seus derivados, os flavonoides (catequina, epicatequina, miricetina, quercetina e canferol), além de ácido ascórbico (Gudej & Tomczyk, 2004).

1.4.1 Avaliação da atividade antioxidante

Por definição, atividade antioxidante é a capacidade que um composto (composição) tem de inibir a degeneração oxidativa (Longhi, 2007) e um grande número de métodos têm sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar a atividade antioxidante dos alimentos. Contudo, devido à complexidade da composição de cada tipo de alimento, tendo em vista que os antioxidantes não atuam separadamente, a possível interação entre eles pode fazer com que a determinação da atividade antioxidante individualmente seja menos efetiva do que a avaliação da atividade antioxidante total. Logo, são numerosas as metodologias para a determinação da atividade antioxidante e podem estar sujeitas a interferências, sendo necessário o emprego de duas ou mais técnicas, pois nenhum método sozinho poderia refletir exatamente a atividade antioxidante total de uma amostra (Li *et al.*, 2008).

1.4.1.1 Método TAA

Outro método frequentemente utilizado para avaliar a atividade antioxidante é o ensaio do fosfomolibdênio. Segundo Prieto *et al.* (1999), o método de complexação pelo fosfomolibdênio para determinação da atividade antioxidante total é baseado na redução do molibdênio VI a molibdênio V pela amostra analisada e subsequente formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio V em pH ácido, determinado espectrofotometricamente a 695 nm. A solução teste inicial possui coloração amarela, tornando-se verde à medida que a solução de fosfato de molibdênio se reduz.

1.4.1.2 Método RP

O poder redutor foi determinado de acordo com Oyaizu (1986), em que o princípio da reação é a doação direta de elétrons na redução de ferricianeto ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$) em ferrocianeto ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]_4$), em meio neutro (pH = 6,6). O produto foi visualizado por adição de íons livres de Fe^{3+} após a reação de redução, que resulta na formação de um complexo com coloração azul intensa, $\text{Fe}_4[\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6]_3$, cuja absorvência foi avaliada em 700 nm. Uma maior absorvência da mistura de reação indica maior poder redutor da amostra.

1.4.1.3 Método FRAP

O método FRAP (poder antioxidante de redução do ferro) é baseado na habilidade de redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} , em pH baixo (Berker, 2009). Quando isso ocorre na presença de 2,4,6-tripiridil-*s*-triazina (TPTZ), a redução é acompanhada pela formação de um complexo ($\text{Fe}^{2+} - \text{TPTZ}$) de cor azul intensa que pode ser monitorado a 593 nm. É um método barato, os reagentes são de fácil preparo, os resultados são altamente reprodutíveis, e o procedimento é simples e rápido (Li *et al.*, 2008). Porém, a medida da capacidade de redução não reflete necessariamente a atividade antioxidante. Nem todo o redutor que tem habilidade de reduzir o ferro é antioxidante e nem todo antioxidante é capaz de reduzir o ferro (ex. glutathiona) (Prior *et al.*, 2003). Além disso, já que este método não inclui nenhum substrato oxidável, ele não fornece informações sobre as propriedades protetoras dos antioxidantes (Frankel & Meyer, 2000).

1.4.1.4 Método ABTS

Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (Fig. 9).

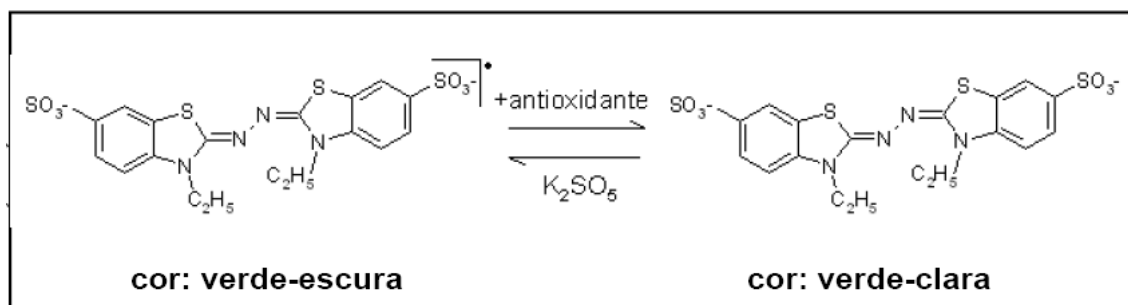


Figura 9. Estabilização do radical $ABTS^{\bullet+}$ por um antioxidante e a sua formação pelo persulfato de potássio. Adaptado de Rufino *et al.* (2007).

O radical monocatiónico $ABTS^{\bullet+}$ é gerado pela oxidação do ABTS [2,2'-azino-bis (3-etil-benzolína-6-sulfonado)] com persulfato de potássio e é reduzido na presença de um hidrogénio doador de eletrões. Este teste pode ser utilizado tanto para substâncias lipofílicas, como para substâncias hidrofílicas, incluindo flavonoides, carotenoides e antioxidantes plasmáticos. Esta metodologia avalia a atividade antioxidante total de substâncias e compostos puros e extratos (Re *et al.*, 1999). Assim, ocorre a formação de um radical cromóforo ($ABTS^{\bullet+}$), onde a atividade oxidante é avaliada pela supressão da cor quando as substâncias antioxidantes são adicionadas ao meio (Longhi, 2007).

1.4.1.5 Método DPPH

O método DPPH (ensaio de redução do radical 2,2 difenil-1-picrilidrazila) é o mais antigo método indireto para a determinação da atividade antioxidante (Olszewska & Michel, 2009). É usado para determinar o potencial antioxidante de compostos fenólicos individuais e alimentares, bem como amostras biológicas relevantes. O teste de DPPH baseia-se na redução do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil na presença de um antioxidante doador de hidrogénio, incluindo compostos fenólicos. Como o DPPH mostra uma absorção muito intensa na zona do visível, pode ser facilmente determinado por espectrofotometria (Ibrahim *et al.*, 2010). Este método tem sido considerado um dos mais representativos para o emprego em modelos de radicais na avaliação da capacidade de remoção de radicais livres. Porém, avalia apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um eletrão se oxida, e por este motivo não deteta substâncias pró-oxidantes (Hirsch, 2010). Além disso, o radical livre formado é sintético. Dessa forma, a atividade antioxidante sobre radicais livres biológicos pode não ser a mesma avaliada neste método.

1.5 Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi estudar o conteúdo em compostos fenólicos e a sua atividade antioxidante em diferentes extratos (aquosos, etanólicos e metanólicos) obtidos de frutos e folhas de plantas de *Rubus* cultivadas e não cultivadas (colhidas no campo) do sul de Portugal, como potenciais fontes de antioxidantes naturais.

Objetivos específicos

- Determinar as principais características físico-químicas dos diferentes frutos estudados;
- Determinar a composição e o conteúdo em compostos bioativos (fitoquímicos), bem como a atividade antioxidante dos diferentes extratos;
- Avaliar estatisticamente a relação entre o teor em compostos fenólicos e a atividade antioxidante;
- Avaliar o efeito do solvente nas propriedades antioxidantes dos extratos de frutos e folhas estudados em plantas de *Rubus*;

2 Materiais e métodos

2.1 Reagentes

Neste estudo foram usados vários reagentes, nomeadamente 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS), 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), reagente Folin-Ciocalteu, trolox, carbonato de sódio, ácido gálico, cloreto de alumínio hexahidratado, quercetina, ácido sulfúrico, tampão fosfato de sódio, molibdato de amónio, ferrocianato de potássio, fosfato monossódico di-hidratado, fosfato disódico di-hidratado, ácido tricloroacético, persulfato de potássio, cloreto de ferro, ácido acético e fenolftaleína foram comprados na Sigma-Aldrich Co. Ltd. O etanol, metanol, cloreto de potássio, acetato de sódio, vanilina, ácido metafosfórico, tampão citrato, dicloroindofenol (DCIP), ácido ascórbico e hidróxido de sódio foram comprados na Merck.

2.2 Material vegetal

Na realização deste estudo foram utilizados frutos de amoreira-preta (*Rubus ulmifolius* Schott) e de framboeseiro (*Rubus idaeus* L.) cultivados em hidroponia na empresa Hubel Produção Agrícola, situada no município de Faro (lat 37° 3' 4.79" N lon 7° 52' 53.45" W) e frutos de espécime não cultivada recolhidos no concelho de Lagos (N 37° 11.172 W 8° 41.582). A colheita das amostras foi efetuada, integralmente em Setembro de 2010, altura do ano em que estes frutos se encontram no estado de maturação mais avançado.

Na Hubel Produção Agrícola, as culturas de *Rubus ulmifolius* Schott e *Rubus idaeus* L. são efetuadas em vasos no solo com linhas de tutoramento, o que garante uma grande acessibilidade e concentração de plantas.

As amostras foram colhidas aleatoriamente, armazenadas em caixas plásticas, devidamente acondicionadas (aproximadamente 200 g) e encaminhadas no próprio dia para o Laboratório de Ciências dos Alimentos da Universidade do Algarve. No laboratório as amostras foram divididas aleatoriamente, sendo uma parte submetida em fresco a análises físico-químicas (pH, Brix, acidez titulável e teor de humidade) e à realização dos extratos necessários para efectuar os testes químicos, após maceração com almofariz de porcelana, e a restante amostra encaminhada para a estufa Binder[®], depois de pesada numa balança digital Ohaus[®] modelo Explorer Pro, secando a 60 °C durante 48 horas. Após a secagem, a amostra foi novamente pesada, triturada e armazenada em eppendorfs a -80 °C para futuras análises. Todas as análises foram efetuadas em triplicado para garantir uma maior fiabilidade nos resultados.

As amostras de folhas das plantas cultivadas (*Rubus ulmifolius* Schott e *Rubus idaeus* L.) foram gentilmente cedidas pela empresa Hubel Produção Agrícola, enquanto as amostras de folhas de plantas não cultivadas (*Rubus ulmifolius* Schott) foram recolhidas na região do Baixo Alentejo (município de Ferreira do Alentejo – 38° 05' 59.43" N 8° 12' 41.33" O) e no Barlavento Algarvio (concelho de Lagos – N 37° 11.172 W 8° 41.582). A colheita das amostras foi efetuada, integralmente, em Setembro de 2010 e foi feita inteiramente ao acaso, imediatamente armazenadas em caixas de plástico, devidamente acondicionadas (aproximadamente 15 gramas de cada amostra) e encaminhadas no próprio dia para o Laboratório de Ciências dos Alimentos da Universidade do Algarve. O material vegetal foi autenticado pelo Coronel José Rosa Pinto (UALG - Herbário da Universidade do Algarve). No laboratório as amostras foram divididas aleatoriamente, pesadas numa balança digital Ohaus[®] modelo Explorer Pro e secas na estufa Binder[®]. Após a secagem a 60°C durante 24 horas, as amostras foram novamente pesadas, trituradas e armazenadas em eppendorfs até preparação dos extratos.

2.3 Preparação dos extratos

Cada amostra fresca/seca foi extraída com diferentes solventes (água destilada, etanol absoluto, metanol absoluto e metanol a 80%). Nas extrações aquosas (25 °C e a 95 °C), 1 g de amostra fresca/seca foi extraída com 10 mL de água destilada à temperatura ambiente e a 95 °C, respetivamente, durante 15 minutos com agitação. As extrações etanólicas e metanólicas (metanol absoluto), foram preparadas com 1 g de amostra fresca/seca e 10 mL de etanol e metanol absoluto, respetivamente, durante 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente com agitação. Após efetuadas todas as extrações, estas foram filtradas com papel de filtro Whatman[®] n° 4 e armazenadas a -20 °C.

Nas extrações metanólicas com metanol a 80% (para futuras análises HPLC-DAD), 1 g de cada amostra fresca/seca foi extraída com 10 ml de metanol a 80% durante 12 horas, a 37°C com agitação orbital. O extrato foi centrifugado a 1500 rpm, a 25 °C, durante 10 minutos, posteriormente filtrado com papel de filtro N° 4 e guardado a -20°C até a realização das análises.

2.4 Metodologia

2.4.1 Caracterização físico-química

2.4.1.1 Determinação de sólidos solúveis totais (°Brix)

Os sólidos solúveis totais (°Brix) foram determinados de acordo com a Norma Portuguesa 785 (1985). Colocou-se 1 gota de amostra fresca filtrada no centro do prisma principal do refratómetro Atago[®], modelo Pocket Pal-1 e procedeu-se à leitura do índice de refração.

2.4.1.2 Determinação do pH

Após a calibração do medidor de pH VWR[®] modelo symPHony com duas soluções tampão a pH 4 e pH 7, foi determinado o valor de pH das frutas maceradas com o auxílio do medidor, equipado com um eletrodo de pH.

2.4.1.3 Determinação da acidez titulável

Este método é aplicável aos diversos produtos de frutas pela determinação da acidez, os resultados são expressos em g de ácido orgânico por grama de amostra fresca, considerando o respetivo ácido predominante na amostra, ou conforme determina o padrão de identidade e qualidade do produto analisado.

O método baseia-se na titulação da amostra com solução de hidróxido de sódio 0,1 M, usando como indicador a fenolftaleína, onde se determina o ponto de equivalência pela medida do pH da solução.

2.4.1.4 Determinação da cor

A determinação da cor foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de análise da cor pela medida direta da absorvência, de acordo com Kelebek *et al.* (2008) e baseado em Glories (1984).

Mediu-se diretamente a absorvência do extrato metanólico (metanol 100%) de cada amostra a 420, 520 e 620 nm, depois de se ler o branco com o solvente usado no extrato.

As percentagens de amarelo (*Ye%*), vermelho (*Rd%*) e azul (*Bl%*) foram calculadas com base nas seguintes equações:

$$\text{Intensidade da Cor (CI)} = Abs_{420} + Abs_{520} + Abs_{620}$$

$$Ye \% = \left(\frac{Abs_{420}}{CI} \right) \times 100$$

$$Rd \% = \left(\frac{Abs_{520}}{CI} \right) \times 100$$

$$Bl \% = \left(\frac{Abs_{620}}{CI} \right) \times 100$$

2.4.1.5 Determinação do teor em humidade

A determinação do teor em humidade foi realizada de acordo com a AOAC (*Association of Analytical Chemists*, 2005).

Secaram-se as placas de Petri na estufa Binder[®] a 80 °C durante 15 minutos, sendo posteriormente transferidas para um exsiccador de vidro onde permaneceram durante uma hora, tendo sido depois determinadas as suas massas numa balança analítica Ohaus[®] modelo Explorer Pro. Colocaram-se 10 g de amostra fresca na placa, sendo esta introduzida na estufa cerca de 48 horas a 60 ± 1 °C. Retirou-se a amostra da estufa e deixou-se arrefecer no exsiccador durante uma hora, tendo-se determinado posteriormente a massa da amostra seca. Voltou-se a colocar na estufa, transferiu-se novamente para o exsiccador e pesou-se até o valor da massa ser constante. O teor em humidade foi determinado por gravimetria, recorrendo à seguinte expressão:

$$\% H = 100 \times \left(\frac{m_f - m_s}{m_f} \right)$$

2.4.2 Compostos fenólicos

2.4.2.1 Determinação do conteúdo em fenólicos totais

A determinação do teor de fenólicos totais foi conduzida de acordo com o método espectrofotométrico proposto por Huang *et al.* (2006), o qual utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu. A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada através de uma curva de calibração de ácido gálico, sendo os valores expressos em mg equivalentes de ácido gálico (GAE) /g de amostra fresca/seca.

Para este teste foram preparadas as seguintes soluções: solução de Folin-Ciocalteu e solução saturada de carbonato de sódio 7,5%.

O extrato (0,1 mL) foi misturado com 0,50 mL de solução de Folin-Ciocalteu e 0,4 mL de solução saturada de carbonato de sódio (7,5%). Após 30 minutos no escuro e à temperatura ambiente, as absorvências foram lidas no espectrofotómetro a 765 nm, contra um branco. As análises foram realizadas em triplicado.

2.4.2.2 Determinação do conteúdo em flavonoides totais

A determinação do teor em flavonoides totais foi efetuada de acordo com o método espectrofotométrico proposto por Lamaison *et al.* (1990). A quantificação dos flavonoides totais foi realizada através de uma curva de calibração com quercetina, sendo os valores expressos em mg equivalentes de quercetina (QE) /g de amostra fresca/seca.

A solução de extrato (0,5 mL) foi misturada com 1,0 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio 2%. Após 10 minutos no escuro e à temperatura ambiente, as absorvências foram lidas no espectrofotômetro a 430 nm, contra um branco. As análises foram efetuadas em triplicado.

2.4.2.3 Determinação do conteúdo em antocianinas monoméricas totais

Este ensaio foi preparado conforme o método de pH-diferencial descrito por Giusti & Wrolstad, 2001.

Foram preparadas as seguintes soluções: tampão cloreto de potássio 0,025 M, pH 1,0 e tampão acetato de sódio 0,4 M, pH 4,5.

O fator de diluição para a amostra foi determinado através da diluição com o tampão a pH 1,0 (volume total de 1 mL), até que a absorvência da amostra no $\lambda_{\text{vis-max}}$ seja inferior a 1,2 (Nota 1). De modo a não ultrapassar a capacidade do tampão, a amostra não deve exceder 20% do volume total. Prepararam-se duas diluições da amostra, uma com pH 1,0 e outra com pH 4,5, diluindo cada uma pelo fator de diluição previamente determinada (volume total de 1 mL). As absorvências de cada diluição foram lidas a $\lambda_{\text{vis-max}}$ e a 700 nm, após 15 minutos à temperatura ambiente e foram lidas contra um branco de água destilada.

A concentração de antocianinas monoméricas na amostra foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{TMA (mg/L)} = (A \times \text{PM} \times \text{FD} \times 1000) / (\epsilon \times 1)$$

Onde,

$$A = (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

2.4.2.4 Determinação do conteúdo em taninos condensados

Este ensaio foi realizado pelo método espectrofotométrico com vanilina, descrito por Tabart *et al.* (2010) e baseado em Nakamura *et al.* (2003). O conteúdo em taninos condensados foi calculado com base numa reta de calibração com catequina e foi expresso em mg equivalentes de catequina (CE) / g de amostra fresco/seca.

Para a realização deste teste foi preparada uma solução de vanilina 1% e uma solução de HCl 9M.

Foram adicionados 0,5 mL de solução de vanilina 1% e 0,5 mL de HCl 9M a 0,2 mL de extrato. Após 20 minutos a 37°C, as absorvências foram lidas a 500 nm no espectrofotómetro, contra um branco.

2.4.2.5 Identificação de compostos fenólicos por HPLC-DAD

Os extratos metanólicos (80%) foram filtrados através de um filtro de 0.45 µm. As análises HPLC-DAD dos ácidos fenólicos e dos flavonoides foram realizadas através de cromatografia líquida Dionex (EUA) equipada com uma bomba solvente modelo P580 (EUA), um injetor automático modelo ASI-100 (EUA), um detetor fotodiodo (DAD) modelo PDA-100 (EUA) e software Dionex. A análise foi promovida através de uma coluna de fase-reversa (25 cm × 4 mm, 5 µm; Merck, Darmstadt, Germany), Lochrospher 100 RP-18, utilizando como fase móvel o metanol e o ácido fórmico a 5%, com um gradiente linear a partir de 15% até 35% durante 30 minutos, numa razão de 1 mL/minuto e com um volume de injeção de 20 µL. Os ácidos fenólicos e os flavonoides foram detetados a 280 e 360 nm, à exceção das antocianinas que foram detetadas a 510 nm.

Os compostos fenólicos foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção com os padrões puros e foram quantificados individualmente, com base numa curva padrão de cada tipo de flavonoide ou ácido fenólico. A quantificação foi realizada com curvas de calibração linear de compostos padrão de acordo com Jaakola *et al.* (2002, 2004).

2.4.3 Determinação do conteúdo em ácido ascórbico

A determinação do teor em ácido ascórbico foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico 2,6 - dicloroindofenol (DCIP), descrito por Tabart *et al.*, (2010). A quantificação do ácido ascórbico foi realizada através de uma curva de

calibração com ácido ascórbico e os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido ascórbico (AAE) / g amostra fresca.

Foram preparados as seguintes soluções para a realização deste teste: tampão citrato, pH 4,15; ácido metafosfórico 5% e 10% e 2,6 – dicloroindofenol (DCIP) (0,1 mg/mL).

A 1 mL de amostra de extrato (diluída em ácido metafosfórico 5%) foi adicionado 0,5 mL de ácido metafosfórico 10% e, de seguida, 0,6 mL desta mistura foram misturados com 0,3 mL de tampão citrato, pH 4,15 e 0,3 mL de DCIP. A absorvência foi lida, posteriormente, no espectrofotómetro contra um branco. O valor do branco foi determinado após a adição de 0,06 mL de AA (1 mg/mL), de modo a medir a interferência da cor na amostra.

2.4.4 Atividade antioxidante

2.4.4.1 Determinação da Atividade Antioxidante Total (TAA)

Este teste foi realizado de acordo com o método do fosfomolibdénio e preparado conforme descrito por Prieto *et al.* (1999). A atividade antioxidante foi calculada com base na curva de calibração com ácido ascórbico e foi expresso em mg equivalentes de ácido ascórbico (AAE) / g amostra fresca/seca.

A 0,1 mL de extrato foi adicionado 1 mL de solução TAA. A solução foi incubada a 95°C durante 90 minutos e, posteriormente, foram lidas as absorvências das amostras a 695 nm, contra um branco.

2.4.4.2 Determinação do poder redutor (RP)

Este método foi realizado de acordo com Oyaizu (1986). A atividade antioxidante foi determinada com base numa reta de calibração com Trolox e os resultados foram expressos em mg equivalentes de Trolox (TE) / g de amostra fresca/seca.

Adicionou-se 0,5 mL de tampão fosfato e 0,5 mL de ferrocianato de potássio a 0,2 mL de extrato; vortexou-se e incubou-se a 50°C, durante 20 minutos. Adicionou-se, posteriormente, 0,5 mL de ácido TCA e centrifugou-se a 650 × g, durante 10 minutos. Recolheu-se 1,0 mL do sobrenadante e adicionou-se 1,0 mL de água destilada e 0,2 mL de cloreto de ferro. As absorvências foram lidas espectrofotometricamente a 700 nm.

2.4.4.3 Determinação da atividade antioxidante avaliada pelo método FRAP

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método de redução do ferro de acordo com Benzie & Strain, 1999. Para a realização deste teste foram preparadas soluções de cloreto de ferro 20 mM, TPTZ 10 mM em HCl 40 mM e tampão acetato 300 mM.

A amostra de extrato (0,1 mL) reagiu com 0,9 mL de solução FRAP e a absorvência foi lida no espectrofotômetro a 593 nm, depois de a mistura ter reagido no escuro durante 30 minutos.

A atividade antioxidante foi calculada com base numa reta de calibração efetuada com Trolox e os resultados foram expressos em mg equivalentes de Trolox (TE) / g amostra fresca/seca.

2.4.4.4 Determinação da atividade antioxidante avaliada pelo método ABTS

O teste de redução do radical ABTS^{•+} foi realizado conforme descrito por Re *et al.* (1999), com algumas modificações.

A uma amostra de extrato (0,05 mL) foi adicionado 1 mL de solução ABTS e a absorvência foi lida a 734 nm, depois de a mistura ter reagido durante 20 minutos.

A atividade antioxidante foi calculada com base numa reta de calibração, utilizando-se o Trolox como antioxidante de referência, cujos resultados foram expressos em mg equivalentes de Trolox / g de amostra fresca/seca.

2.4.4.5 Determinação da atividade antioxidante avaliada pelo método DPPH

O método de redução do radical livre DPPH foi realizado de acordo com o descrito por Yen *et al.*, 2000.

A uma amostra de extrato (0,5 mL) foram adicionados 0,5 mL de solução de DPPH e, após 30 minutos no escuro à temperatura ambiente, a absorvência da mistura foi lida espectrofotometricamente a 517 nm.

Neste teste, a atividade antioxidante também foi calculada através de uma reta de calibração efetuada com Trolox e os resultados expressos da forma anteriormente referida.

Todas as análises dos métodos descritos foram realizadas em triplicado para garantir uma maior fiabilidade nos resultados.

2.5 Análise estatística

A análise estatística foi efetuada com o auxílio do programa informático Excel (Microsoft Office 2007), para a elaboração de gráficos e tabelas.

Com o objetivo de se testarem diferenças entre os frutos/folhas e os diferentes extratos estudados, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) e aplicado o teste de Bonferroni a todos os resultados, utilizando o programa informático SPSS 17.0. Foi ainda realizada, neste programa, uma análise de correlação bivariada, utilizando o coeficiente de correlação de *Pearson* com o objetivo de verificar se os parâmetros testados se relacionam entre si. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão para mostrar as variações nos vários dados experimentais. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$

3 Resultados e discussão

3.1 Influência do solvente na composição físico-química e na atividade antioxidante de diferentes extratos de frutos de plantas *Rubus*

3.1.1 Introdução

Estudos epidemiológicos têm mostrado a importância do consumo de frutos na dieta humana para a prevenção de doenças coronárias, cancro e diabetes. O efeito protetor dos frutos tem sido atribuído à presença de polifenóis e de ácido ascórbico (Wang *et al.*, 1996). Tem sido dedicada particular atenção ao género *Rubus* devido à sua alta atividade antioxidante, conteúdo em fenóis e em antocianinas. No entanto, existe uma variação significativa no conteúdo em compostos fenólicos e na atividade antioxidante nas diferentes espécies existentes (Garzón *et al.*, 2009).

As espécies *Rubus ulmifolius* Schott (amora-preta) e *Rubus idaeus* L. (framboesa) são da família *Rosaceae* e nativas da Europa, Ásia e Norte de África. De climas temperados de regiões subtropicais, estas espécies são arbustivas de porte ereto ou rasteiro e são frutas bastante apreciadas pelas suas cores atrativas, sabores suculentos e agri-doce (Castroviejo *et al.*, 1998). Os seus frutos são consumidos frescos ou preparados como compotas, geleias ou vinhos.

Cerca de 95% da produção, tanto em fresco, como congelada destina-se ao mercado externo e apenas 5% ao mercado interno. As grandes superfícies de venda, as gelatarias e as confeitarias são os principais clientes para estes produtos.

Estes produtos podem ser uma potencial fonte de nutracêuticos, corantes e antioxidantes naturais, sendo a determinação de fenólicos totais, atividade antioxidante e conteúdo em ácido ascórbico de *Rubus ulmifolius* Schott e *Rubus idaeus* L. do interesse de investigadores, uma vez que podem ter potencial comercial para aplicação em novos produtos. Assim, este estudo teve como principais objetivos a sua caracterização físico-química, e o estudo do efeito do solvente no conteúdo em fenólicos totais e na atividade antioxidante de extratos aquosos, etanólicos e metanólicos de frutos frescos (*Rubus ulmifolius* Schott e *Rubus idaeus* L.) obtidos no sul de Portugal (Algarve), como potenciais fontes de antioxidantes naturais.

3.1.2 Resultados e Discussão

3.1.2.1 Caracterização físico-química dos frutos (*Rubus*)

Os frutos foram analisados em relação a várias características físico-químicas. Os valores dos diferentes parâmetros estudados apresentam-se na Tabela 2.

O pH em *Rubus ulmifolius* Schott e *Rubus idaeus* L. é um dos responsáveis pelas características organolépticas e coloração, juntamente com a acidez total e outros compostos relacionados (Santana *et al.*, 2008). O pH é um parâmetro que mede de uma forma geral a acidez de frutas e alimentos, sendo este o indicador do tipo de tratamento necessário para a conservação dos alimentos. O aumento do pH está diretamente relacionado com o decréscimo da acidez ocorrida com o avanço da maturação dos frutos (Silva *et al.*, 2008).

Os valores de pH apresentados pelos frutos estudados variaram de 3,03 a 4,70, tendo o espécime RUN2 apresentado o valor mais elevado e a RIC apresentado o valor mais baixo. No entanto, não se verificou diferenças significativas entre as duas plantas cultivadas (3,30 e 3,03 para RUC e RIC, respetivamente) e todos os resultados obtidos se situaram dentro dos valores conhecidos para estes frutos (Pio *et al.*, 2010).

A concentração de sólidos solúveis determina a doçura do fruto durante a maturação e está relacionada com o seu sabor (Kawamata, 1997). Neste estudo, o espécime RUN2 obteve um valor bastante mais elevado (15,20° Brix), relativamente às duas plantas cultivadas (8,10 e 7,33° Brix em RUC e RIC, respetivamente). Estes valores foram semelhantes aos observados por Hassimoto *et al.* (2008), que obteve teores de sólidos solúveis para espécies cultivadas destes frutos entre 6,9 e 9,2° Brix. Contudo, estudos realizados na Grécia (Pantelidis *et al.*, 2007), relatam variações no conteúdo de sólidos solúveis em espécimes não cultivados de *Rubus ulmifolius* Schott inferiores (9,8 a 11,5° Brix) ao encontrado neste estudo (15,20° Brix). Estas variações podem estar relacionadas com diferenças nas características dos solos das regiões de cultivo.

A acidez e o teor de açúcar são dois importantes parâmetros utilizados como referência para classificar as polpas para a produção de sumos. Jacques & Zambiasi (2011) relatou valores de acidez de 1,33 g de ácido cítrico /g amostra para *Rubus ulmifolius* Schott e Pio *et al.* (2010) apresentou valores de acidez de 2,20 relativamente à espécie *Rubus idaeus* L. As amostras avaliadas neste estudo mostraram-se, assim, boas matérias-primas para a fabricação de sumos e polpas, com valores de acidez que

variaram de 0,40 a 2,21 g de ácido cítrico / g amostra. A RUN2 foi a que mostrou um valor de acidez mais baixo (0,40 g ácido cítrico/g amostra), como seria de esperar, uma vez que este espécime foi o que apresentou também uma maior concentração em sólidos solúveis. Estes valores de acidez titulável possivelmente ocorrem devido às altas temperaturas da região (28 a 34 °C), que coincidem com a época de maturação dos frutos. Segundo Hirsch (2011), as temperaturas elevadas favorecem baixa acidez. Este autor comenta que valores acima de 1,5 são considerados de acidez elevada.

A amora-preta e a framboesa apresentam alto conteúdo em água, o que foi confirmado pelos resultados encontrados nas amostras estudadas neste trabalho, as quais apresentaram valores de 73,07, 70,99 e 64,26% de água nos espécimes RUN2, RUC e na espécie RIC, respetivamente. Estes dados estão de acordo com Cavaco (2007) e Hirsch (2011) que reportam valores de humidade para os mesmos frutos de 69,34 e 73,43 %. O Brix está relacionado com o teor de sólidos solúveis nas amostras, logo está relacionado com o teor de humidade das mesmas, ou seja, amostras com teor de humidade mais elevado possuem menor Brix.

A cor é um parâmetro importante para produtores e consumidores, pois indica se o fruto apresenta ou não as condições ideais para comercialização e consumo. Porém, a cor, na maioria dos casos, não contribui para um aumento efetivo no valor nutritivo ou qualidade do produto (Hirsch, 2011). No entanto, em geral, os consumidores têm preferência por frutos de cor forte e brilhante. Na avaliação da cor, utilizando o método espectrofotométrico, a intensidade da cor (*CI*) foi de 2,18 e 1,26 nas plantas RUN2 e RUC, respetivamente e 0,57 na planta RIC. Quanto maior o valor de *CI*, maior a intensidade da cor da amostra. A RUN2 apresentou menor percentagem de vermelho (*Rd*) mas uma maior intensidade da cor (*CI*), em relação à RUC e RIC, o que possivelmente aumenta a sua aceitação por parte dos consumidores. A maior percentagem de azul (*Bl*) por parte da RUN2, que lhe confere a cor púrpura (entre o vermelho e o azul), pode estar relacionada com a grande quantidade de compostos fenólicos presentes neste espécime.

A intensidade da cor pode estar relacionada com o tipo de clima que poderá influenciar os valores de pH, os quais estão relacionados com a formação de pigmentos. Isto verificou-se neste estudo, uma vez que os valores de *CI*, *Ye* e *Bl* se relacionam de uma forma direta com os valores de pH.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos analisados de plantas de *Rubus*.

Parâmetros	RUN 2	RUC	RIC
pH	4,7 ± 0,10 ^a	3,30 ± 0,01 ^b	3,03 ± 0,05 ^b
° Brix	15,20 ± 0,10 ^a	8,10 ± 0,20 ^b	7,33 ± 0,15 ^c
Acidez titulável ⁱ	0,40 ± 0,00 ^c	1,14 ± 0,01 ^b	2,21 ± 0,01 ^a
Humidade (%)	73,07 ± 0,51 ^a	70,99 ± 0,68 ^b	64,26 ± 0,39 ^c
<i>CI</i>	2,18 ± 0,01 ^a	1,26 ± 0,05 ^b	0,59 ± 0,03 ^c
<i>Ye (%)</i>	42,57 ± 0,10 ^a	31,30 ± 0,47 ^c	33,49 ± 0,50 ^b
<i>Rd (%)</i>	36,11 ± 0,00 ^b	61,29 ± 0,48 ^a	61,66 ± 0,54 ^a
<i>Bl (%)</i>	21,52 ± 0,44 ^a	6,71 ± 0,30 ^b	4,53 ± 0,11 ^c

Nota: Os resultados são a média ± desvio padrão (n = 3). ^a valores expressos em g de ácido cítrico por grama de amostra fresca. *CI*: intensidade da cor; *Ye*: tendência ao amarelo; *Rd*: tendência ao vermelho; *Bl*: tendência ai azul. Os valores com letras diferentes, na mesma linha, são significativamente diferentes (p <0,05).

3.1.2.2 Conteúdo em compostos fenólicos

Conteúdo em fenólicos totais

Uns dos mais importantes componentes antioxidantes das plantas, os compostos fenólicos, têm sido bastante investigados em plantas medicinais, frutos e vegetais (Ibrahim *et al.*, 2010). Acredita-se que esta atividade antioxidante seja devido, principalmente, às suas propriedades de redução (Zheng & Wang, 2001), que desempenham um papel importante na adsorção e neutralização dos radicais livres e/ou na decomposição de peróxidos.

O conteúdo em fenólicos totais foi estimado pelo método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu, usando o ácido gálico como padrão de compostos fenólicos. O conteúdo em fenólicos totais de extratos aquosos, etanólicos e metanólicos de frutos do género *Rubus* é apresentado na Tabela 3.

A concentração em fenólicos dependeu da planta e do solvente usado na extração. De entre os extratos estudados, os valores de fenólicos variaram entre 0,48 e 2,57 mg GAE / g amostra fresca. Os extratos de RUN2 apresentaram maior conteúdo em fenólicos (1,02 a 2,57 mg GAE/g amostra fresca), relativamente aos extratos de RUC e RIC. De entre as duas plantas cultivadas, a RUC (1,09 a 1,88 mg GAE/g

amostra fresca) obteve maior conteúdo em fenólicos totais, relativamente à RIC (concentrações inferiores a 1,32 mg GAE/g amostra fresca). Os resultados mostram ainda que a espécie *Rubus ulmifolius* Schott, independentemente de ser cultivada ou não cultivada, apresenta um maior conteúdo em fenólicos, relativamente à espécie *Rubus idaeus* L. Estes valores são baixos quando comparados com valores reportados por Amensour *et al.* (2010) para os mesmos frutos cultivados (9,00 mg GAE /g amostra para extrato etanólico e 14,68 mg GAE/ g amostra para extrato metanólico). Uma explicação possível para esta diferença de concentrações é a variação dos níveis fenólicos de acordo com a localização e a estação do ano em que os frutos foram colhidos (Garzón *et al.*, 2009). No entanto, os resultados apresentados neste estudo apresentam um nível similar de conteúdo fenólico em relação a valores de *Rubus ulmifolius* Schott (espécimes cultivados e não cultivados) e *Rubus idaeus* L. (3,07 a 3,20 mg GAE / g amostra) reportados por Benvenuti *et al.* (2004). Esta variação de valores reportada nestes frutos pode ser devida a diferenças nos métodos de extração.

No que diz respeito aos solventes usados nas extrações, verificou-se que a quantidade de fenólicos foi maior quando extraídos com metanol e água a 95°C. Através da estatística ($p < 0,05$), verificou-se ainda, que não existem diferenças significativas entre estes dois solventes, em todos os frutos estudados (Tabela 3). Estes resultados sugerem, assim, que de entre os solventes estudados, a utilização de extratos aquosos a 95°C será a melhor opção para a extração de compostos fenólicos nestes frutos, uma vez que a manipulação do metanol está associada a riscos para a saúde. Este solvente apresenta efeitos de toxicidade no sistema nervoso. Por outro lado, os extratos etanólicos apresentaram as concentrações em fenólicos mais baixas, em todas as plantas estudadas. Estes resultados estão de acordo com os de Amensour *et al.* (2010), que relata que os melhores solventes de extração de compostos fenólicos em frutos são a água ou o metanol. Este autor relata ainda que os extratos etanólicos foram os que apresentaram menor eficiência de extração. Segundo Amensour *et al.* (2010), o rendimento de extração de compostos fenólicos aumenta com o aumento da polaridade do solvente.

Conteúdo em flavonoides totais

O conteúdo em flavonoides totais foi estimado pelo método espectrofotométrico proposto por Lamaison et al. (1990), usando a quercetina como padrão. Os resultados obtidos nos diferentes extratos de frutos analisados foram apresentados na Tabela 3. Tal como aconteceu nos fenólicos totais, as concentrações de flavonoides totais nos vários extratos estudados dependeram tanto da planta estudada como da natureza do solvente.

Os valores de flavonoides totais variaram de 0,02 a 0,39 mg QE/g amostra fresca. O espécime não cultivado (RUN2) apresentou os conteúdos mais elevados (concentrações de 0,14 a 0,39 mg QE/g amostra fresca) de flavonoides em todos os tipos de extratos estudados, em comparação com os cultivados. Por outro lado, observou-se que de entre as plantas estudadas, a *Rubus idaeus* L. (RIC) foi a que apresentou as concentrações mais baixas (valores inferiores a 0,08 mg QE/g amostra fresca) relativamente à *Rubus ulmifolius* Schott (tanto cultivada como não cultivada). Estes valores estão de acordo com Gudej & Tomczyk (2004), que reportam concentrações em flavonoides totais de 0,49, 0,35 e 0,35 mg QE/g amostra fresca em *Rubus ulmifolius* Schott não cultivada, cultivada e *Rubus idaeus* L. cultivada, respetivamente.

Os extratos metanólicos mostraram as maiores concentrações de flavonoides nas plantas analisadas (0,39, 0,32 e 0,08 mg QE/g amostra fresca em RUN2, RUC e RIC, respetivamente), seguidos dos extratos aquosos a 95°C e a 25°C. À semelhança dos fenólicos totais, os extratos etanólicos apresentaram os menores conteúdos em flavonoides totais, ou seja, estes extratos possuem uma capacidade de extração de flavonoides totais baixa. É de referir, ainda, que não se verificaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dois extratos aquosos estudados (25 e 95°C), nas amostras analisadas (Tabela 3). Estes dados são corroborados por Amensour et al. (2010), que estudou extratos de frutos semelhantes aos estudados neste trabalho. Este autor mostrou que os extratos metanólicos apresentaram o maior conteúdo em flavonoides, seguidos dos extratos aquosos e que os extratos etanólicos obtiveram os conteúdos mais baixos.

A forte correlação existente entre o conteúdo em fenólicos totais e o conteúdo em flavonoides totais ($R^2 = 0,829$), indica que a maioria dos compostos fenólicos presentes nos extratos estudados são flavonoides (Tabela 6).

Assim, conclui-se que os extratos de frutos de *Rubus* estudados neste trabalho, apresentam características benéficas para a saúde humana, uma vez que os flavonoides

têm sido reportados por exercerem múltiplos efeitos biológicos devido aos seus antioxidantes e habilidade para reduzir os radicais livres. Muitos investigadores têm reportado os efeitos anti-inflamatórios, antivirais e antialérgicos destes compostos.

Conteúdo em antocianinas monoméricas totais

Os vários benefícios que as frutas vermelhas apresentam para a saúde, incluindo os efeitos antioxidantes, estão também associados com a presença de antocianinas (Dai *et al.*, 2009). A presença e a quantidade de cada pigmento estão relacionadas com vários fatores, incluindo a temperatura de crescimento, o estado de maturação na altura da colheita e o stress ambiental (Wang & Zheng, 2001). O conteúdo em antocianinas monoméricas totais dos extratos de frutos das plantas *Rubus ulmifolius* Schott e *Rubus idaeus* L. foi apresentado na Tabela 3. Observou-se que o conteúdo em antocianinas variou de 0,05 a 0,53 mg/g amostra fresca. A RUN2 apresentou as concentrações mais elevadas (valores de 0,13 a 0,53 mg/g amostra fresca), enquanto a espécie cultivada *Rubus idaeus* L. (RIC) mostrou os resultados mais baixos (concentrações inferiores a 0,30 mg/g amostra fresca).

Por outro lado, foram os extratos aquosos a 95°C os que obtiveram os maiores teores em antocianinas totais e os etanólicos os que apresentaram os conteúdos mais baixos nos diferentes tipos de extratos, ainda que não se tenham verificado diferenças significativas entre os extratos etanólicos e aquosos a 25°C, no espécime RUC. Segundo Gómez-Plaza *et al.* (2006), a água é o solvente mais eficiente quando o objetivo é obter corantes ou produtos antioxidantes para a indústria alimentar.

Garzón *et al.* (2009) encontrou quantidades de antocianinas em espécies de *Rubus* semelhantes às obtidas neste estudo (0,45 mg/g amostra fresca) e Wang *et al.* (2000) relatou ainda concentrações de 0,09 mg/g amostra fresca em *Rubus ulmifolius* Schott cultivada e de 0,07 mg/g amostra fresca em *Rubus idaeus* L., valores um pouco inferiores aos obtidos neste trabalho. O valor de antocianinas totais relatado por Jacques & Zambiasi (2010) para *Rubus ulmifolius* Schott cultivada foi superior aos encontrados neste estudo (1,16 mg/g peso fresco). Estas variações podem ser justificadas pelas diferenças nas condições de extração, nomeadamente o solvente utilizado, ou pelas condições de crescimento das plantas.

Contudo, estes conteúdos em antocianinas torna estas plantas potenciais fontes de nutracêuticos, pigmentos e antioxidantes naturais. Estas plantas, além dos nutrientes usuais como as vitaminas e minerais, são ricas em antocianinas, flavonoides e ácidos

fenólicos. As antocianinas mostraram ainda ser eficazes na inibição da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade, as quais podem ter efeitos na saúde humana (Wang *et al.*, 2000).

Estudos anteriores (Ozgen *et al.*, 2009) reportaram uma forte correlação entre o conteúdo em fenólicos totais e os níveis de antocianinas de frutos de plantas de *Rubus*. Neste trabalho, obteve-se um elevado coeficiente de correlação ($R^2=0,720$) entre o conteúdo em antocianinas monoméricas totais e o conteúdo em fenólicos totais, assim como uma correlação significativa ($R^2 = 0,644$) entre o conteúdo em antocianinas totais e o conteúdo em flavonoides totais, o que indica que as antocianinas monoméricas presentes nestas plantas contribuem substancialmente para o seu conteúdo em compostos fenólicos.

Conteúdo em taninos condensados

O conteúdo em taninos condensados foi avaliado de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Tabart *et al.* (2010) e baseado em Nakamura *et al.* (2003), usando a vanilina como padrão. Os resultados obtidos para os extratos de frutos de plantas de *Rubus* foram bastante elevados (Tabela 3). As concentrações variaram de 1,52 a 31,75 mg CE/g amostra fresca. A espécie *Rubus ulmifolius* Schott obteve concentrações bastante mais elevadas (valores de 17,63 a 31,75 mg CE/g amostra fresca) relativamente à espécie *Rubus idaeus* L. (valores inferiores a 2,41 mg CE/g amostra fresco), ainda que seja mais uma vez, a RUN2 que apresente os valores mais elevados (concentrações de 19,26 a 31,75 mg CE/g amostra fresco).

No que diz respeito ao poder de extração dos diferentes solventes, o metanol foi o que apresentou a maior capacidade de extração de taninos condensados nos dois espécimes de *Rubus ulmifolius* Schott estudados (31,75 e 27,36 mg CE/g amostra fresca para RUN2 e RUC, respetivamente). Relativamente à espécie *Rubus idaeus* L. (RIC), não se verificaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes extratos estudados (Tabela 3). O solvente que mostrou o menor poder de extração foi o etanol (19,26, 17,63 mg CE/g amostra fresca em RUN2 e RUC, respetivamente), ainda que não se tenham verificado diferenças significativas entre estes extratos e os aquosos. Neste sentido, pode afirmar-se que o conteúdo nestes compostos depende tanto da natureza do solvente como da planta analisada.

Olszewska *et al.* (2009) relatou valores de taninos condensados de 0,82 mg CE/g amostra fresca para frutos de espécies da mesma família que as estudadas neste trabalho

e Gudej & Tomczyk, (2004) apresentou teores de 6,50, 4,12 e 2,62 mg CE/g amostra fresca em *Rubus ulmifolius* Schott não cultivada, cultivada e *Rubus idaeus* L. cultivada, respetivamente, valores estes bastante inferiores aos reportados neste estudo. Pode concluir-se, assim, que os frutos estudados neste trabalho são fontes ricas em taninos condensados. Várias doenças degenerativas como o cancro, a esclerose múltipla, arteriosclerose e o próprio processo de envelhecimento estão associados a altas concentrações intercelulares de radicais livres. Estudos anteriores (Jimoh *et al.*, 2010) mostraram que os taninos beneficiam a saúde devido ao seu efeito quimiopreventivo e à sua atividade antimicrobiana, uma vez que atuam como redutores de radicais livres, os quais intercetam o oxigénio ativo, formando radicais estáveis.

Tabela 3. Conteúdo em compostos fenólicos de diferentes extratos de frutos de *Rubus*.

Extratos	Fenólicos totais	Flavonoides	Antocianinas	Taninos
RUN 2				
Aquoso (25° C)	2,11 ± 0,24 ^{ab}	0,29 ± 0,01 ^b	0,19 ± 0,01 ^d	22,02 ± 0,51 ^c
Aquoso (95° C)	2,47 ± 0,10 ^a	0,32 ± 0,00 ^b	0,53 ± 0,02 ^a	22,53 ± 0,47 ^c
Etanólico	1,02 ± 0,22 ^c	0,14 ± 0,00 ^d	0,13 ± 0,02 ^e	19,26 ± 2,48 ^{cd}
Metanólico	2,57 ± 0,03 ^a	0,39 ± 0,01 ^a	0,41 ± 0,01 ^b	31,75 ± 0,74 ^a
RUC				
Aquoso (25° C)	1,50 ± 0,13 ^{cd}	0,21 ± 0,00 ^c	0,16 ± 0,01 ^{de}	18,15 ± 0,47 ^b
Aquoso (95° C)	1,45 ± 0,09 ^{cd}	0,23 ± 0,01 ^c	0,43 ± 0,03 ^b	19,26 ± 2,48 ^{cd}
Etanólico	1,09 ± 0,02 ^c	0,20 ± 0,01 ^{cd}	0,15 ± 0,00 ^e	17,63 ± 0,51 ^d
Metanólico	1,88 ± 0,29 ^{bd}	0,32 ± 0,06 ^b	0,31 ± 0,01 ^c	27,36 ± 0,74 ^b
RIC				
Aquoso (25° C)	1,22 ± 0,11 ^c	0,02 ± 0,00 ^f	0,15 ± 0,00 ^e	1,58 ± 0,09 ^e
Aquoso (95° C)	1,29 ± 0,09 ^c	0,03 ± 0,01 ^{ef}	0,30 ± 0,01 ^c	2,08 ± 0,20 ^e
Etanólico	0,48 ± 0,11 ^e	0,04 ± 0,01 ^{ef}	0,05 ± 0,00 ^f	1,52 ± 0,33 ^e
Metanólico	1,32 ± 0,18 ^c	0,08 ± 0,00 ^e	0,07 ± 0,01 ^f	2,41 ± 0,34 ^e

Nota: Os resultados são a média ± desvio padrão (n = 3). O conteúdo em fenólicos totais foi expresso em mg de GAE/g de amostra fresca. O conteúdo em flavonoides totais foi expresso em mg QE/g de amostra fresca, o conteúdo em antocianinas monoméricas totais foi expresso em mg antocianinas/g amostra fresca e o conteúdo em taninos condensados foi expresso em mg de CE/g amostra fresca. Os valores com diferentes letras, na mesma coluna, são significativamente diferentes (p < 0,05).

Identificação de compostos fenólicos por HPLC-DAD

O conteúdo em fenólicos totais determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu não consegue fornecer uma imagem total da quantidade e, especialmente, da qualidade dos constituintes fenólicos dos extratos de frutos estudados. Desta forma, procedeu-se à identificação de compostos fenólicos individuais através de HPLC-DAD equipado com um detetor fotodiodo. O perfil de compostos fenólicos dos extratos de frutos de *Rubus* analisados foi apresentado na Tabela 4.

Neste estudo, foram identificados com sucesso dez compostos fenólicos, de acordo com o tempo de retenção e as características espectrais. Os cromatogramas dos diferentes extratos estudados permitiram identificar três flavonóis (quercetina, miricetina e canferol), duas catequinas (catequina e epicatequina), três antocianinas (delfinidina 3, delfinidina 3,5 e pelargonidina 3,5), e dois ácidos fenólicos (ácido cafeico e gálico).

Os três flavonóis foram identificados nas plantas estudadas em concentrações significativas, no entanto o espécime não cultivado (RUN2) apresentou teores mais elevados (39,14, 13,09 e 9,31 $\mu\text{g/g}$ amostra de quercetina, miricetina e canferol, respetivamente). A quercetina possui várias propriedades farmacológicas, tais como anti-inflamatórias, antiviral, anticancerígenas, anti-histamínicas, entre outras. No que diz respeito às catequinas, a epicatequina foi identificada nas duas plantas cultivadas e a RUC mostrou a maior concentração neste composto (13,36 $\mu\text{g/g}$ amostra). As catequinas presentes em frutos e vegetais têm sido consideradas agentes terapêuticos, devido aos seus efeitos benéficos na saúde, como a sua suposta proteção contra alguns tipos de cancro, doenças cardiovasculares e o envelhecimento (Carvalho *et al.*, 2011). Contudo, o ácido cafeico foi o composto fenólico que apresentou a maior concentração nesta planta (31,80 $\mu\text{g/g}$).

Relativamente às três antocianinas identificadas, estas só foram encontradas na RUN2, no entanto em elevadas concentrações (307,07, 368,08 e 23,75 $\mu\text{g/g}$ amostra de delfinidina 3, delfinidina 3,5 e pelargonidina 3,5, respetivamente). A delfinidina 3 e 3,5 são descritas como tendo efeito inibitório na oxidação dos lípidos, nos processos inflamatórios, entre outros (Cavaco, 2007). O facto de só se terem identificado antocianinas no espécime não cultivado é justificado pelo facto de uma das maiores dificuldades na identificação de antocianinas individuais ser a falta de padrões, e da escolha do método a ser utilizado depender do objetivo de análise. Na deteção da presença de antocianinas num tecido vegetal, um simples método espectrofotométrico

pode ser suficiente. No entanto, a identificação de antocianinas individuais exigem métodos mais avançados como o HPLC-DAD. O método espectrofotométrico utilizado neste estudo identifica antocianinas monoméricas totais, ao passo que as antocianinas identificadas por HPLC são poliméricas.

Por outro lado, a espécie RIC mostrou um elevado conteúdo em ácido gálico (536,87 µg/g), em comparação com a outra espécie. Estudos anteriores (Jacques & Zambiasi, 2010) relataram que os ácidos fenólicos encontrados em maiores quantidades em extratos de frutos de plantas de *Rubus* foram o ácido gálico e cafeico. Este autor identificou ainda elevadas concentrações de quercetina e canferol nestas espécies. Estes dados estão de acordo com os resultados reportados por Chim (2008), que também descreve o ácido gálico como sendo o ácido fenólico predominante (com cerca de 60% dos ácidos fenólicos identificados) em frutos de plantas *Rubus*.

Na verdade, a elevada correlação entre o conteúdo em fenólicos totais e a atividade antioxidante encontrada nestas plantas pode ser explicada pela presença destes compostos maioritários. Estudos anteriores indicaram que estes benzoatos são agentes antioxidantes fortes, reduzem radicais e peróxidos de hidrogénio (Trabelsi *et al.*, 2010). O ácido gálico tem sido usado como aditivo para evitar a degradação dos alimentos e é conhecido pelas suas atividades anti-inflamatória, anti-mutagénica e anticancerígena. Os antioxidantes naturais como os polifenóis são interessantes tanto para os investigadores alimentares como para os profissionais de saúde. Estes compostos têm sido adicionados a alimentos para estabilizá-los mas também tem sido expresso um interesse considerável pelas suas funções como agentes terapêuticos. Os ácidos fenólicos como o ácido gálico e cafeico estão associados a propriedades organoléticas, nutricionais e antioxidantes de alimentos e estes resultados sugerem que os flavonóis e as catequinas, juntamente com o ácido gálico e cafeico desempenham um papel fundamental nas propriedades nutricionais destes frutos.

Quando se compara o conteúdo em fenólicos totais avaliado pelo método espectrofotométrico e o total de compostos fenólicos detetado por HPLC, são notórias as diferenças de conteúdos. Isto deve-se ao facto do método de Folin-Ciocalceu não ser um método específico, uma vez que determina todos os fenólicos presentes no extrato, além de substâncias redutoras adicionadas aos alimentos ou naturalmente presentes que podem interferir com os resultados, incluindo proteínas extraíveis. Outra limitação deste método é a interferência de reduzir substâncias como o ácido ascórbico.

Tabela 4. Concentrações de compostos fenólicos determinados por HPLC de extratos de frutos de *Rubus*.

Compostos	RUN 2	RUC	RIC
Flavonóis			
Quercetina	39,14 ± 0,00 ^a	27,06 ± 10,20 ^b	1,65 ± 0,11 ^c
Miricetina	13,09 ± 0,00 ^a	7,35 ± 2,81 ^a	3,30 ± 0,14 ^b
Canferol	9,31 ± 0,00 ^a	9,09 ± 0,07 ^a	3,02 ± 0,04 ^b
Total	61,54	43,50	7,97
Catequinas			
(+)-Catequina	ND	ND	3,46 ± 0,00
(-) -Epicatequina	ND	13,36 ± 0,00 ^a	2,62 ± 0,00 ^b
Total	ND	13,36	6,08
Antocianinas			
Dp 3,5	307,07 ± 0,00	ND	ND
Dp 3	368,08 ± 0,00	ND	ND
Pg 3,5	23,75 ± 0,00	ND	ND
Total	698,9	ND	ND
Ácido hidroxicinâmico			
Ácido cafeico	ND	31,80 ± 0,00	ND
Total	ND	31,80	ND
Ácido hidroxibenzóico			
Ácido gálico	17,84 ± 0,00 ^b	5,96 ± 0,02 ^b	536,87 ± 22,82 ^a
Total	17,84	5,96	536,87

Nota: Os resultados são a média ± desvio padrão (n=3) e são expressos em µg/g amostra fresca. Os valores com diferentes letras, na mesma linha, são significativamente diferentes (p <0,05). ND, não detetado.

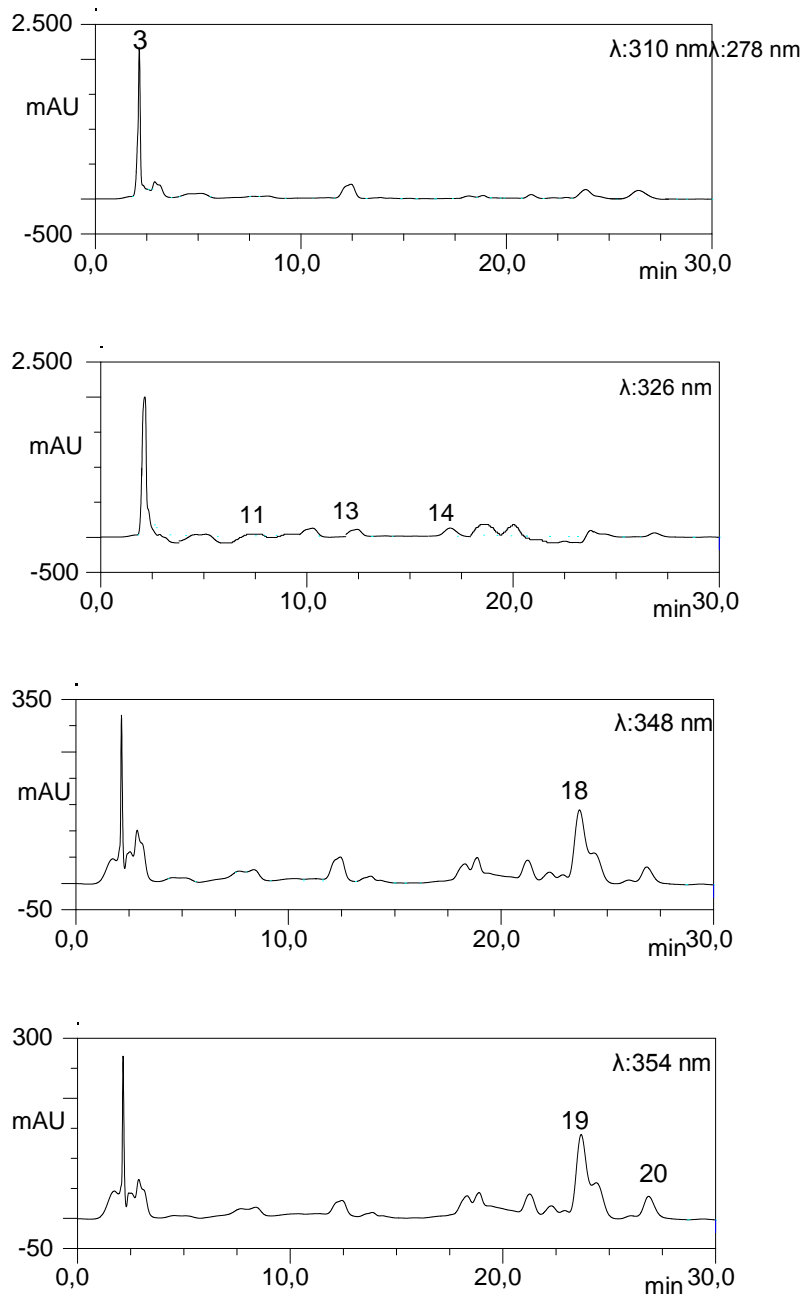


Figura 10. Cromatogramas de HPLC-DAD a 310, 326, 348 e 354 nm de compostos fenólicos da espécie RUN2 (*Rubus ulmifolius* Schott). Picos: 3- ácido gálico; 11- delfinidina 3,5- diglucosido; 13 –pelargonidina 3,5-diglucosido; 14 – delfinidina 3- glucosido; 18 – canferol; 19 – miricetina; 20 – quercetina.

3.1.2.3 Conteúdo em ácido ascórbico

O teor em ácido ascórbico de frutas pode variar dependendo da espécie, da fase de maturação na época da colheita, de variações genéticas, da intensidade da luz durante o crescimento, do manuseamento pós-colheita e das condições de extração (Jacques & Zambiasi, 2011). Neste estudo, o conteúdo em ácido ascórbico foi avaliado de acordo com o método espectrofotométrico 2,6 - dicloroindofenol (DCIP) descrito por Tabart *et al.* (2010) e os resultados obtidos foram apresentados na Tabela 5. As concentrações de ácido ascórbico variaram de 0,08 a 0,55 mg AAE/g amostra fresca e o espécime não cultivado (RUN2) apresentou os melhores resultados em todos os extratos estudados (concentrações de 0,20 a 0,55 mg AAE/g amostra fresca), enquanto a RUC e RIC não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre si (valores de 0,08 a 0,48 mg AAE/g amostra fresco).

Relativamente aos solventes analisados, verificou-se que o metanol possui a maior capacidade de extração de ácido ascórbico (0,55, 0,46 e 0,48 mg AAE/g amostra fresca em RUN2, RUC e RIC, respetivamente), ainda que no espécime não cultivado (RUN2) não se tenham verificado diferenças significativas entre o extrato metanólico e o aquoso a 95 °C. Por outro lado, as extrações etanólicas e aquosas (25 e 95 °C) mostraram poderes de extração idênticos (concentrações inferiores a 0,23 mg AAE/g amostra fresca) em RUC e RIC. Hirsch (2011) relatou ainda valores de ácido ascórbico em espécimes cultivados de *Rubus ulmifolius* Schott entre 0,01 e 0,03 mg ácido ascórbico / g amostra fresca, valores estes bastante inferiores aos reportados neste estudo. Contudo, Pantelidis *et al.* (2007) apresentou resultados semelhantes aos deste estudo (concentrações entre 0,14 e 0,32 mg AAE/g amostra fresca em plantas cultivadas de *Rubus ulmifolius* Schott e *Rubus idaeus* L.).

De acordo com Wang *et al.* (2000), a fase de maturação mais avançada em alguns frutos, como *Rubus ulmifolius* Schott e *Rubus idaeus* L. é a fase em que ocorre um aumento na atividade antioxidante e, normalmente, o estado de maturação do fruto é baseado apenas na avaliação da sua cor superficial. Portanto, estas variações nos teores em ácido ascórbico de frutos da mesma espécie, além da natureza do solvente utilizado, podem ser justificadas pelo facto de se encontrarem em fases de maturação diferentes. Após a observação destes resultados, pode afirmar-se que os frutos estudados possuem características nutricionais interessantes, uma vez que o ácido ascórbico é necessário ao homem na síntese de vários neurotransmissores importantes, no metabolismo do ácido fólico e nas reações metabólicas de certos aminoácidos (Santana *et al.*, 2008). Pode

ainda concluir-se que os frutos estudados são fontes ricas em antioxidantes naturais que podem ser utilizados na indústria farmacêutica, alimentar e/ou cosmética.

A correlação significativa observada ($R^2=0,757$) entre o conteúdo em ácido ascórbico e a atividade antioxidante apresentada pelos vários extratos estudados sugere ainda que este composto contribui fortemente para a atividade antioxidante destes frutos.

3.1.2.4 Atividade antioxidante

Atividade antioxidante total (TAA)

A escolha deste teste deveu-se ao facto deste ser utilizado com diferentes solventes e possuir alta capacidade de avaliação da atividade antioxidante. Esta atividade dos extratos estudada foi expressa em mg equivalentes ácido ascórbico (AAE) / g amostra fresca e os resultados obtidos são mostrados na Tabela 5. Os valores observados apontam para uma elevada atividade antioxidante (concentrações de 1,95 a 8,24 mg AAE/g amostra fresca). No entanto, é no espécime não cultivado (RUN2) que se verifica a maior atividade antioxidante à semelhança do que se verificou no conteúdo em compostos fenólicos.

Os extratos aquosos a 95°C e os metanólicos (8,24, 6,90 e 6,30 mg AAE/g amostra fresca em RUN2, RUC e RIC, respetivamente) foram os que apresentaram uma maior capacidade de extração, ou seja, maior capacidade de redução de molibdénio VI a molibdénio V, não existindo diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estes dois tipos de extratos (Tabela 5). Assim, estes resultados sugerem que de entre os solventes estudados, a utilização de extratos aquosos a 95°C será a melhor opção para a extração de compostos fenólicos nestes frutos, uma vez que a manipulação do metanol está associada a riscos para a saúde, como já foi referido anteriormente. Em contraste, os extratos etanólicos foram os que mostraram uma atividade antioxidante mais baixa (concentrações inferiores a 4,86 mg AAE/g amostra fresca). Isto sugere que a capacidade de extração de antioxidantes varia com a polaridade do solvente usado na extração. Com estes resultados pode concluir-se que os valores de atividade antioxidante dependem da planta estudada e do solvente usado na extração. Carvalho *et al.* (2010) reportou valores semelhantes para extratos metanólicos idênticos, concluindo-se assim que os extratos estudados neste trabalho apresentam uma elevada atividade antioxidante.

Poder Redutor (RP)

A capacidade dos diferentes extratos de frutos analisados para reduzir o Fe^{3+} (ião ferricianeto) foi analisada pelo método de Oyaizu (1986) e a Tabela 5 mostra os resultados obtidos de poder redutor para os vários extratos estudados. Em geral, observou-se um elevado poder de redução das amostras, variando os valores de 0,61 a 3,77 mg TE/g amostra fresca. O maior poder redutor foi observado pela RUN2 (os valores variam de 1,14 a 3,77 mg TE/g amostra fresca), o que seria de esperar uma vez que este espécime foi o que também obteve maior conteúdo em fenólicos totais e são estes os responsáveis pela redução do Fe^{3+} . Por outro lado, verificou-se que a utilização de diferentes solventes influencia o poder redutor da amostra a ser analisada. Os resultados indicam que os extratos metanólicos (concentrações de 3,77, 1,76 e 1,72 mg TE/g amostra fresca para as RUN2, RUC e RIC, respetivamente) apresentam o maior poder redutor e os extratos etanólicos (valores inferiores a 1,14 mg TE/g amostra seca) mostram ter o menor poder redutor.

Estes resultados indicam que os extratos metanólicos (que também apresentaram elevado conteúdo em fenólicos totais) têm o melhor impacto sobre a atividade antioxidante. Estas observações sugerem que tanto a polaridade do solvente como a natureza fenólica da planta influencia fortemente a estimativa da atividade antioxidante.

Tabela 5. Conteúdo em fenólicos totais, ácido ascórbico e atividade antioxidante de extratos de frutos de *Rubus*.

Extratos	Fenólicos	Ácido ascórbico	TAA	RP
RUN 2				
Aquoso (25° C)	2,11 ± 0,24 ^{ab}	0,28 ± 0,03 ^{bc}	6,99 ± 1,08 ^{ab}	2,50 ± 0,14 ^c
Aquoso (95° C)	2,47 ± 0,10 ^a	0,42 ± 0,08 ^{ab}	7,22 ± 0,94 ^{ab}	2,90 ± 0,03 ^b
Etanólico	1,02 ± 0,22 ^c	0,20 ± 0,07 ^{cd}	3,39 ± 0,08 ^{ef}	1,14 ± 0,01 ^{ef}
Metanólico	2,57 ± 0,03 ^a	0,55 ± 0,01 ^a	8,24 ± 0,71 ^a	3,77 ± 0,12 ^a
RUC				
Aquoso (25° C)	1,50 ± 0,13 ^{cd}	0,08 ± 0,03 ^d	6,32 ± 0,94 ^{bc}	1,27 ± 0,01 ^e
Aquoso (95° C)	1,45 ± 0,09 ^{cd}	0,23 ± 0,09 ^{cd}	5,76 ± 0,71 ^{bcd}	1,25 ± 0,04 ^e
Etanólico	1,09 ± 0,02 ^c	0,20 ± 0,06 ^{cd}	4,86 ± 0,13 ^{bcd^e}	0,70 ± 0,06 ^h
Metanólico	1,88 ± 0,29 ^{bd}	0,46 ± 0,07 ^{ab}	6,90 ± 0,62 ^{ab}	1,76 ± 0,08 ^d
RIC				
Aquoso (25° C)	1,22 ± 0,11 ^c	0,17 ± 0,07 ^{cd}	3,81 ± 0,44 ^f	0,80 ± 0,03 ^{gh}
Aquoso (95° C)	1,29 ± 0,09 ^c	0,17 ± 0,07 ^{cd}	4,48 ± 0,24 ^{ced}	1,00 ± 0,02 ^{fg}
Etanólico	0,48 ± 0,11 ^e	0,15 ± 0,03 ^{cd}	1,95 ± 0,29 ^f	0,61 ± 0,05 ^h
Metanólico	1,32 ± 0,18 ^c	0,48 ± 0,02 ^a	6,30 ± 1,46 ^{abc}	1,72 ± 0,02 ^d

Nota: Os resultados são a média ± desvio padrão (n=3). O conteúdo em fenólicos totais são expressos em mg GAE/g amostra fresca e o conteúdo em ácido ascórbico são expressos em mg AAE/g amostra fresca. A atividade antioxidante total foi expressa em mg AAE/g amostra fresca e o poder redutor foi expresso em mg TE/g amostra fresca. Os valores com diferentes letras, na mesma coluna, são significativamente diferentes (p < 0,05).

Atividade antioxidante avaliada pelos métodos FRAP, ABTS e DPPH

Os métodos FRAP, ABTS e DPPH são os mais usados na avaliação da atividade antioxidante em alimentos e sistemas biológicos. No entanto, a determinação da atividade antioxidante ainda tem alguns problemas por resolver. A principal dificuldade é a comparação exata dos resultados obtidos por diferentes laboratórios, devido à variabilidade das condições experimentais usadas. Os resultados dos testes FRAP, ABTS e DPPH dependem fortemente da reatividade dos vários padrões fenólicos e da reatividade dos extratos a esses três ensaios. Assim, foi usado o mesmo padrão de fenólicos (Trolox) nos diferentes ensaios de avaliação da atividade antioxidante para que fosse possível comparar os resultados de uma forma mais exata.

Foi observada uma grande variação na atividade antioxidante entre os diferentes extratos de frutos analisados (Tabela 6). Os valores de FRAP variaram de 0,45 a 1,64 mg TE/g amostra fresca, o ensaio DPPH mostrou valores entre 0,04 e 0,65 mg TE/g amostra fresca, enquanto o ensaio ABTS apresentou os valores mais elevados de atividade antioxidante (de 0,93 a 4,16 mg TE/g amostra fresca). A RUN2 exibiu maior atividade antioxidante, tanto no ensaio ABTS como nos ensaios FRAP e DPPH, em comparação com a RUC e a RIC.

Garzón *et al.* (2009) reportou valores de 1,13, 0,5 e 0,02 mg TE/g amostra fresca para os métodos FRAP, ABTS e DPPH, respectivamente. Estes valores estão de acordo com valores reportados por outros autores para outras plantas de *Rubus* (0 a 0,64 mg TE/g amostra fresca), que têm sido recomendadas pelo seu valor nutricional devido à sua elevada atividade antioxidante. No entanto, os valores reportados por estes autores são bastante inferiores aos obtidos neste estudo, o que leva a concluir que os frutos analisados neste estudo são, em geral, fontes ricas em antioxidantes. Contudo, existem vários fatores que podem ser responsáveis por estas diferenças observadas, nomeadamente as condições de crescimento, maturação, origem geográfica, tipo de solo, quantidade de luz solar recebida, condições de armazenamento, entre outros.

Por outro lado, a capacidade para avaliar a atividade antioxidante por parte dos diferentes métodos estudados depende, além da planta, da natureza do solvente usado no processo de extração. Assim, após a análise dos resultados do ensaio FRAP, verificou-se que os extratos metanólicos apresentaram o maior poder de extração de antioxidantes, isto é, estes extratos possuem a maior habilidade para reduzir o complexo TPTZ-Fe (III) em TPTZ-Fe (II). No entanto, o etanol mostrou a menor capacidade de

extração na RUN2. A RUC e RIC não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os extratos aquosos e etanólicos (Tabela 6).

Relativamente ao método ABTS, foram os extratos aquosos (25 e 95°C) e os metanólicos que apresentaram a melhor capacidade de extração de antioxidantes, não se verificando diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estes extratos. O etanol apresentou a menor capacidade de extração de antioxidantes neste ensaio, ou seja, exibiu a menor atividade para reduzir o radical ABTS^{•+}. Pode concluir-se, então, que os extratos aquosos e metanólicos das plantas de *Rubus* estudadas neste trabalho exercem os seus efeitos de redução do radical ABTS^{•+} a concentrações mais baixas que os extratos etanólicos.

No que diz respeito ao ensaio DPPH, os resultados indicam que extratos diferentes possuem variação significativa na sua atividade inibitória contra o radical. Notou-se que os extratos metanólicos possuem elevada habilidade para reduzir o radical DPPH, enquanto os extratos aquosos (25 e 95°C) mostraram a menor atividade anti radical. O efeito dos antioxidantes no método DPPH deve-se à sua capacidade para doar hidrogénios. A habilidade dos extratos para reduzirem o radical DPPH mostra que estes extratos têm capacidade para doar prótons e poderiam agir como inibidores ou redutores de radicais livres, atuando possivelmente como antioxidantes primários.

O ensaio FRAP avalia o potencial dos antioxidantes para reduzirem o ferro (III) por substâncias eletrodoadoras em condições ácidas, enquanto os ensaios ABTS e DPPH avaliam a capacidade dos antioxidantes para reduzirem os radicais ABTS^{•+} e DPPH, respetivamente. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, pode concluir-se que as plantas estudadas apresentam maior capacidade para reduzir o radical ABTS^{•+}, em comparação com a sua capacidade para reduzir o radical livre DPPH e de reduzir o ferro (III). Os resultados sugerem ainda que os antioxidantes presentes nestes extratos são fracos redutores do ferro (III) e do radical ABTS^{•+} quando extraídos com etanol e são fracos redutores do radical livre DPPH quando extraídos com água, pelo que estes extratos precisariam de concentrações mais elevadas para obterem efeitos significantes.

Tabela 6. Atividade antioxidante de extratos de frutos de *Rubus*, avaliada por três métodos diferentes.

Extratos	FRAP	ABTS	DPPH
RUN 2			
Aquoso (25° C)	1,29 ± 0,02 ^b	3,92 ± 0,93 ^{ab}	0,18 ± 0,01 ^d
Aquoso (95° C)	1,43 ± 0,19 ^b	4,20 ± 0,59 ^a	0,16 ± 0,02 ^d
Etanólico	0,62 ± 0,02 ^{ef}	2,43 ± 0,69 ^c	0,33 ± 0,01 ^c
Metanólico	1,64 ± 0,05 ^a	4,16 ± 0,75 ^a	0,65 ± 0,02 ^a
RUC			
Aquoso (25° C)	0,98 ± 0,00 ^{cd}	1,85 ± 0,10 ^{cdf}	0,04 ± 0,02 ^g
Aquoso (95° C)	1,05 ± 0,04 ^c	2,08 ± 0,23 ^{cdf}	0,07 ± 0,01 ^{fg}
Etanólico	0,91 ± 0,04 ^{cd}	1,27 ± 0,10 ^{cdf}	0,31 ± 0,02 ^c
Metanólico	1,39 ± 0,04 ^b	2,47 ± 0,36 ^{bcd}	0,31 ± 0,00 ^c
RIC			
Aquoso (25° C)	0,56 ± 0,02 ^f	1,01 ± 0,05 ^{cdf}	0,10 ± 0,01 ^{ef}
Aquoso (95° C)	0,58 ± 0,03 ^f	1,08 ± 0,19 ^{cdf}	0,12 ± 0,01 ^e
Etanólico	0,45 ± 0,02 ^f	0,93 ± 0,01 ^f	0,32 ± 0,01 ^c
Metanólico	0,80 ± 0,01 ^{de}	2,22 ± 0,38 ^{cef}	0,48 ± 0,00 ^b

Nota: Os resultados são a média ± desvio padrão e são expressos em mg TE/g amostra fresca. Os valores com diferentes letras, na mesma coluna, são significativamente diferentes (p < 0,05).

3.1.2.5 Correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo em fenólicos totais e flavonoides totais

Os valores estimados do conteúdo em fenólicos totais exibem uma correlação linear significativa com as atividades antioxidantes apresentadas (Tabela 7). As correlações diretas entre os resultados obtidos nos dois testes de avaliação da atividade antioxidante total e o conteúdo em fenólicos totais foram elevadas ($R^2 = 0,849$ para TAA e fenólicos, $R^2 = 0,907$ para RP e fenólicos, e $R^2 = 0,780$ para TAA e RP). Estas correlações elevadas podem confirmar que os compostos fenólicos são dos constituintes mais importantes na determinação da atividade antioxidante dos extratos de *Rubus*. Estes dados estão de acordo com o estudado por Amensour *et al.* (2010), o qual mostra que um alto conteúdo em polifenóis totais aumenta a atividade antioxidante e que existe uma correlação linear entre o conteúdo em fenólicos e a atividade antioxidante. Estes resultados sugerem, ainda, que a atividade antioxidante existente nos extratos estudados provem, substancialmente, dos compostos fenólicos e estes podem ser usados como indicadores importantes da sua atividade antioxidante, atuando como uma indicação preliminar na escolha dos extratos para uso de fontes naturais de antioxidantes e ingredientes funcionais.

Por outro lado, verificou-se também uma forte correlação entre o conteúdo em fenólicos totais e a atividade antioxidante avaliada pelo método ABTS ($R^2 = 0,824$) e entre o conteúdo em fenólicos e a atividade antioxidante avaliada pelo método FRAP ($R^2 = 0,896$). Olszewska *et al.* (2009) relatou resultados similares aos obtidos neste estudo ($R^2 = 0,794$ para fenólicos e ABTS, e $R^2 = 0,940$ para fenólicos e FRAP). Estes resultados foram evidências claras de que os extratos de *Rubus* são ricos em fenólicos e que estes são determinantes na atividade antioxidantes destes extratos. Este autor reportou ainda que o coeficiente de correlação entre a atividade antioxidante e polifenóis foi mais elevado quando o método usado para avaliar a atividade antioxidante foi o ensaio ABTS, relativamente a outros métodos, o que também foi verificado neste estudo, uma vez que o coeficiente de correlação entre o conteúdo em fenólicos e a atividade antioxidante avaliada através do método DPPH foi baixo ($R^2 = 0,186$). Isto indica que os antioxidantes não têm capacidade para reduzir o radical livre DPPH como têm para reduzir o radical ABTS^{•+} e/ou reduzir o ferro (III).

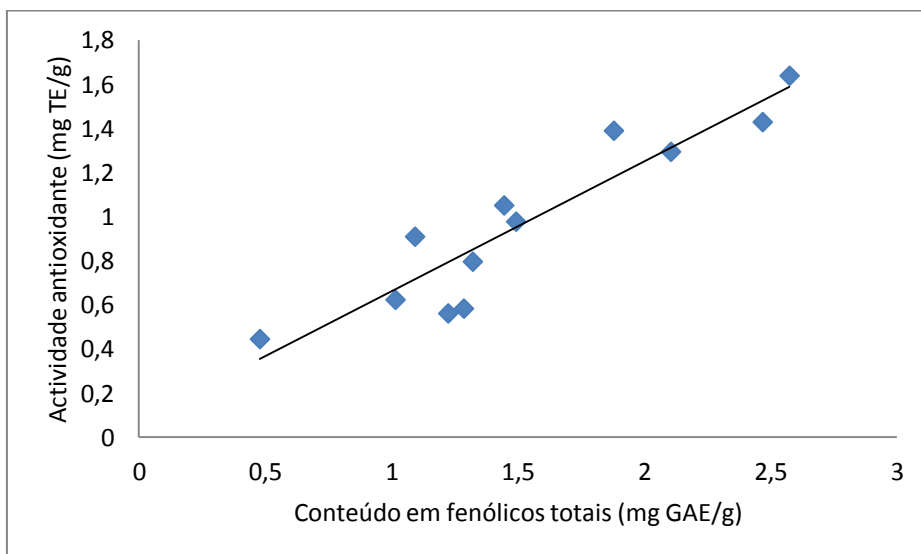
Relativamente aos flavonoides totais, foram notórias as fortes correlações existentes entre estes compostos e a atividade antioxidante avaliada pelos diferentes métodos. Observou-se uma elevada correlação entre os flavonoides totais e a atividade

antioxidante total ($R^2=0,773$) e entre estes compostos e o poder redutor ($R^2=0,788$). Os flavonoides possuem diversas atividades biológicas como anti-inflamatória, anticancerígena e anti-aterosclerótica. Estas atividades podem estar relacionadas com sua atividade antioxidante (H.-B. Li *et al.*, 2008).

Observou-se ainda uma forte correlação entre o conteúdo em flavonoides totais e a atividade antioxidante avaliada pelo método FRAP ($R^2= 0,949$) e pelo método ABTS ($R^2= 0,793$), o que sugere que os flavonoides são um dos compostos fenólicos que contribuem fortemente para a atividade antioxidante destes extratos. Olszewska *et al.* (2009) corroborou com estes resultados, apresentando coeficientes de correlação próximos dos obtidos neste estudo ($R^2=0,845$ entre os flavonoides e o método ABTS e $R^2=0,857$ entre os flavonoides e o método FRAP), podendo concluir-se, assim, que um elevado conteúdo em flavonoides é um fator importante na determinação da atividade antioxidante destas plantas estudadas.

A figura 12 mostra ainda a forte correlação existente entre os métodos FRAP e ABTS ($R^2=0,784$), sugerindo que os antioxidantes presentes nestes extratos foram capazes de reduzir os radicais livres ($ABTS^{\bullet+}$) e de reduzir os oxidantes (íons férrico). A partir destes dados, verificou-se que os frutos de *Rubus* estudados apresentam uma elevada atividade antioxidante. Estes frutos são, portanto, valiosas fontes de antioxidantes naturais, tanto para a preparação de extratos frescos como para um maior isolamento e purificação de componentes antioxidantes.

A



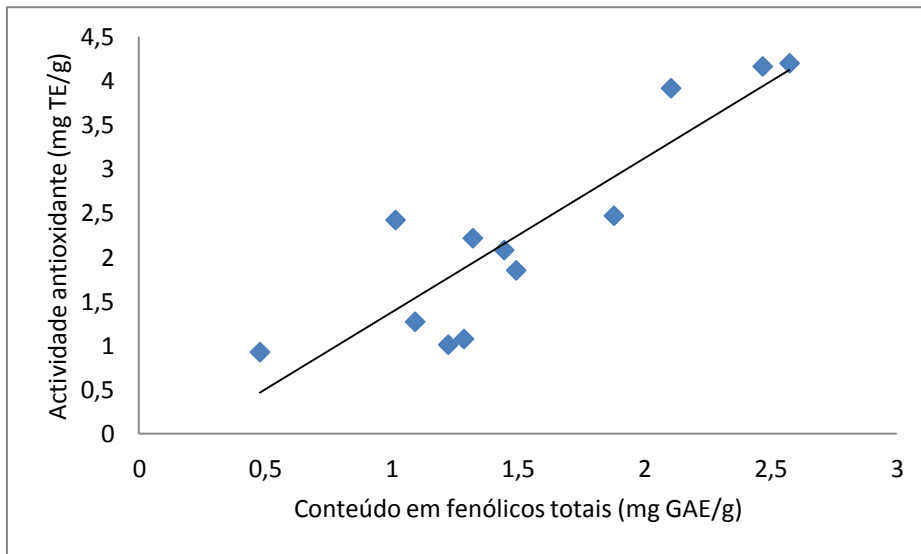
B

Figura 11. Correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo em fenólicos totais. A atividade antioxidante foi avaliada pelo método FRAP (A) e pelo método ABTS (B), respetivamente. $R^2 = 0,896$ (A) e $R^2 = 0,824$ (B).

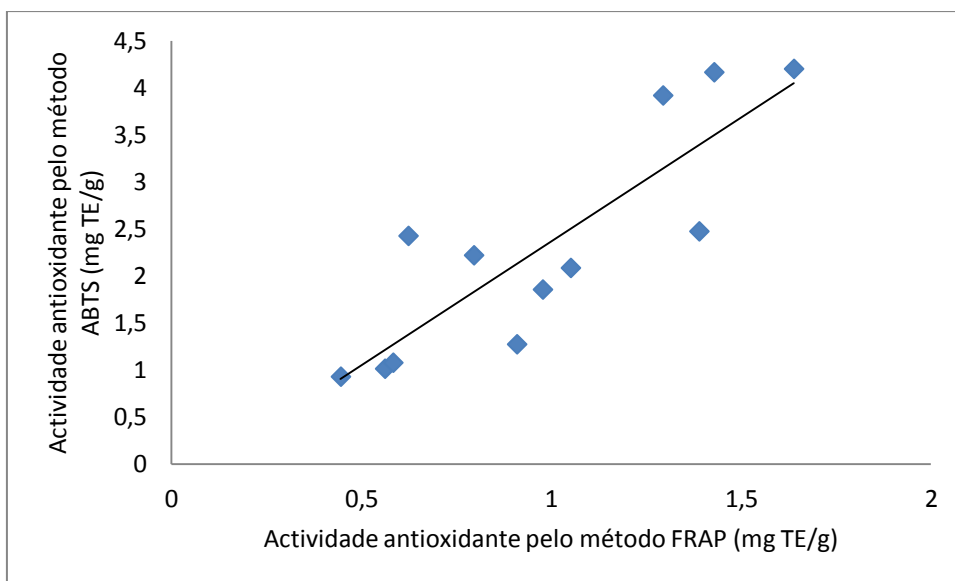


Figura 12. Correlação entre a atividade antioxidante avaliada pelos métodos FRAP e ABTS. $R^2=0,784$

Tabela 7. Coeficientes de correlação (R^2) entre os diferentes métodos estudados nos extratos de frutos de *Rubus*.

	Fenólicos	Flavonoides	Antocianinas	Taninos	Ác. ascórbico	TAA	RP	FRAP	ABTS	DPPH
Fenólicos	1	0,829*	0,720*	0,705*	0,630*	0,849*	0,907*	0,896*	0,824*	0,186
Flavonoides		1	0,644*	0,949*	0,564*	0,773*	0,788*	0,949*	0,793*	0,263
Antocianinas			1	0,577*	0,436*	0,565*	0,602*	0,687*	0,545*	-0,088
Taninos				1	0,466*	0,655*	0,670*	0,864*	0,722*	0,240
Ác. ascórbico					1	0,626*	0,757*	0,667*	0,663*	0,663*
TAA						1	0,780*	0,867*	0,677*	0,210
RP							1	0,856*	0,902*	0,464*
FRAP								1	0,784*	0,280
ABTS									1	0,318
DPPH										1

* . Correlação é significativa a $p < 0,05$.

3.1.3 Conclusão

Os valores de pH, acidez titulável e conteúdo de açúcares apresentados pelos frutos estudados (*Rubus*) levam a concluir que estes são boas matérias-primas para a fabricação de sumos, xaropes, gelados e polpas devido ao seu elevado valor nutricional. Os frutos estudados mostraram-se propícios para a industrialização, uma vez que apresentam valores de pH, acidez e conteúdo de açúcares que lhes conferem características ideais para a formação de gel, dispensando, assim, o uso de aditivos como os acidulantes, reduzindo o custo de produção da geleia. É de referir também que a RUN2 apresentou menor tendência ao vermelho e maior intensidade de cor, o que poderia aumentar a aceitação da fruta consumida em fresco pelo consumidor, já que este é um importante parâmetro avaliado pelos mesmos.

Os resultados indicam a presença de compostos com excelente atividade antioxidante proveniente dos frutos de *Rubus* estudados. No entanto, a planta RUN2 foi a que apresentou os maiores conteúdos em compostos bioativos e, conseqüentemente, a maior atividade antioxidante. As diferenças de concentrações verificadas podem dever-se à variação de compostos bioativos de acordo com a localização, o tipo de solo, as condições de crescimento, a fase de maturação na altura da recolha, da quantidade de luz solar recebida, das condições de armazenamento das diferentes plantas, entre outras.

Com base nos valores obtidos neste estudo, conclui-se que a capacidade de extração de compostos bioativos e de antioxidantes naturais depende da estereoseletividade do solvente usado na extração. Desta forma, verificou-se que os extratos aquosos a 95°C e os metanólicos se revelaram os melhores solventes de extração para avaliação dos frutos de *Rubus* estudados, ainda que a utilização de extratos aquosos a 95°C seja a melhor opção para avaliar estes frutos, uma vez que a manipulação do metanol está associada a riscos para a saúde. Este solvente apresenta efeitos de toxicidade no sistema nervoso. As características físico-químicas destes solventes assemelham-se em maior grau às características da maioria dos compostos fenólicos e dos antioxidantes presentes nos extratos avaliados.

As diferenças observadas na atividade antioxidante, quando são utilizados diferentes solventes de extração, podem ser maiores se a amostra analisada for um alimento, visto que representa uma matriz complexa de diferentes componentes, que podem estabelecer, entre si e com os solventes, inúmeras e diferentes interações. As diferenças significativas encontradas na atividade antioxidante avaliadas pelos diferentes métodos, foram influenciadas pela polaridade e pelo pH dos solventes, com valores maiores em solventes mais polares e pHs maiores.

Os dados obtidos revelam ainda que as correlações entre a atividade antioxidante e o conteúdo em fenólicos totais e flavonoides totais podem depender do método escolhido e das características hidrofóbicas e hidrofílicas do método e dos antioxidantes testados. Desta forma, verificou-se que as plantas estudadas contêm elevadas quantidades de compostos fenólicos (flavonoides, antocianinas, taninos) e ácido ascórbico, os quais se correlacionam de uma forma bastante significativa ($p < 0,05$) com a atividade antioxidante avaliada pelos métodos ABTS e FRAP, sugerindo que estes compostos bioativos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante apresentada por estes extratos. Por outro lado, as correlações pouco significativas ($p < 0,05$) observadas entre a atividade antioxidante avaliada pelo método DPPH e o conteúdo em fenólicos totais e flavonoides totais, sugere que os antioxidantes presentes nos extratos estudados não possuem tanta habilidade para reduzirem o radical livre DPPH como possuem para reduzir o radical livre ABTS^{•+} e reduzir os oxidantes (ião férrico).

Contudo, as plantas estudadas demonstram ser fontes ricas de antioxidantes naturais, que podem ser usadas na indústria alimentar, farmacêutica, cosmética, entre outras, aumentando o valor nutricional dos produtos.

3.2 Efeito do solvente na atividade antioxidante e conteúdo em compostos fenólicos em diferentes extratos de folhas cultivadas e não cultivadas (*Rubus*)

3.2.1 Introdução

Nos últimos anos de pesquisas, tornou-se conhecido que os compostos fenólicos de plantas são a classe mais importante de antioxidantes. Os sistemas antioxidantes endógenos, desempenham um papel significativo na proteção do stress oxidativo no corpo humano, causado pelo aumento dos níveis prejudiciais das espécies reativas do oxigênio. A atividade antioxidante de fenólicos de plantas fornece mecanismos importantes em plantas medicinais e ingredientes alimentares, incluindo a prevenção do processo de envelhecimento e várias doenças crônicas como doenças cardiovasculares, aterosclerose, cataratas, diabetes *mellitus*, distúrbios neuro degenerativos e hepatotoxicidade (Olszewska *et al.*, 2009). O interesse crescente pelas propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos presentes em diferentes plantas também deriva da sua forte atividade e baixa toxicidade comparada com outros antioxidantes fenólicos sintéticos, que são normalmente usados como antioxidantes no processamento de alimentos. Embora a variedade de plantas comestíveis e não-comestíveis (plantas medicinais, vegetais, frutos, nozes, especiarias, cereais, entre outras) seja estudada pela sua atividade antioxidante e conteúdo em fenólicos, apenas algumas foram identificadas como suficientemente ricas em compostos fenólicos para serem usadas numa produção rentável de antioxidantes naturais capazes de substituir os sintéticos. De acordo com estudos anteriores, só 10% das plantas estudadas apresentaram um elevado conteúdo em fenólicos totais. Portanto, é bastante importante encontrar novas fontes ricas de antioxidantes baratos, seguros e fortes de origem natural.

O género *Rubus* compreende cerca de 700 espécies, que ocorrem naturalmente em climas temperados. Algumas destas espécies têm sido usadas na medicina tradicional, devido às suas propriedades medicinais (Gudej & Tomczyk, 2004). As folhas destas espécies são conhecidas pelas suas propriedades adstringentes, antidiarreicas, hipoglicémicas, antibacterianas, anti-inflamatórias, sudoríficas e coleréticas. Têm sido, geralmente, usadas no tratamento de doenças do sistema cardiovascular. Estas folhas são ainda conhecidas pelos seus benefícios no tratamento da febre, gripe, dores menstruais e diabetes. Investigações fitoquímicas anteriores (Gudej & Tomczyk, 2004), realizadas em espécies de *Rubus* revelaram a presença de metabólitos secundários estrutural e biogeneticamente diferentes.

Assim, este estudo teve como principal objetivo avaliar o efeito de diferentes solventes (água, etanol e metanol) na atividade antioxidante e no conteúdo em compostos fenólicos em diferentes extratos de folhas de plantas cultivadas e não cultivadas (*Rubus*), obtidas no sul de Portugal, como potenciais fontes de antioxidantes naturais.

3.2.2 Resultados e discussão

3.2.2.1 Compostos fenólicos

Conteúdo em fenólicos totais

O conteúdo em fenólicos totais dos diferentes extratos de folhas estudados foi medido pelo método de Folin-Ciocalteu e é mostrado na Tabela 8. Em geral, os extratos apresentaram alto conteúdo em fenólicos totais, variando de 0,71 a 15,09 mg GAE/g amostra seca. As plantas não cultivadas apresentaram os melhores resultados, ainda que tenham sido os extratos de folhas do Algarve (RUN1) que mostraram o maior conteúdo fenólico (15,09 mg GAE/g amostra seca) nos quatro tipos de extratos estudados, seguidos dos extratos de RUN2 (11,82 mg GAE/g amostra seca). Por outro lado, os valores mais baixos de fenólicos totais foram observados na RIC, em todos os extratos analisados. Buricová *et al.* (2011) e Wang *et al.* (2000) relataram valores de 62,4 a 75,4 mg GAE/g amostra seca e de 47,2 a 82,8 mg GAE/g amostra seca, respetivamente, para as mesmas espécies mas com outras condições de extração (concentrações dos extratos mais elevadas e maior tempo de extração), o que pode justificar os valores significativamente mais baixos deste estudo.

Contudo, Trabelsi *et al.* (2010) mostra valores de fenólicos totais, em geral, mais baixos relativamente aos obtidos neste estudo, para os mesmos tipos de extratos (2,6, 1 e 15,85 mg GAE/g amostra seca para extratos aquosos, etanólicos e metanólicos, respetivamente). Por outro lado, estes resultados levam a concluir que as plantas não cultivadas apresentam os conteúdos mais elevados em fenólicos totais, relativamente às plantas cultivadas.

Os resultados mostraram ainda que o conteúdo em fenólicos totais nos extratos de folhas de *Rubus* variou consideravelmente em função da natureza do solvente (de 5,29 a 9,26 mg GAE/g amostra seca, de 7,14 a 15,09 mg GAE/g amostra seca, de 0,71 a 2,76 mg GAE/g amostra seca e de 4,48 a 6,43 mg GAE/g amostra seca para extratos aquosos a 25°C, aquosos a 95°C, etanólicos e metanólicos, respetivamente). Estes resultados demonstram claramente a influência do solvente na extração dos compostos antioxidantes, em particular

na extração dos fenólicos. Estes valores estão também de acordo com estudos prévios (Amensour *et al.*, 2010), os quais mostram que a natureza do solvente exerce um grande poder na capacidade de extração dos fenólicos em várias espécies. De acordo com o estudo publicado anteriormente por Amensour *et al.* (2010), os extratos aquosos são, efetivamente, os extratos mais poderosos na extração de compostos fenólicos, ao contrário do etanol puro que revela ter o poder de extração mais baixo, o que se verificou neste estudo. O presente estudo mostra, assim, que os sistemas de extração com solventes de polaridades diferentes, diferem significativamente na sua capacidade e seletividade de extração de compostos fenólicos em folhas de *Rubus*.

Em conclusão, pode afirmar-se que os extratos estudados são excelentes fontes de compostos fenólicos, os quais possuem uma potencial atividade antioxidante que muitas vezes é procurada em produtos alimentares e em vários tratamentos medicinais.

Conteúdo em flavonoides totais

O conteúdo em flavonoides totais foi estimado pelo método espectrofotométrico proposto por Lamaison *et al.* (1990), usando a quercetina como flavonoide padrão. O conteúdo em flavonoides totais de extratos aquosos, etanólicos e metanólicos de folhas de *Rubus* é apresentado na Tabela 8. Tal como nos fenólicos totais, também o conteúdo em flavonoides totais dependeu tanto da natureza do solvente como da planta usada na extração. Os valores variaram de 0,33 a 2,38 mg QE/g amostra seca. Neste teste foram observadas diferenças bastante significativas ($p < 0,05$) entre os três espécimes de *Rubus ulmifolius* Schott estudados, uma vez que o RUN1 e o RUC apresentaram os maiores teores em flavonoides totais, ao contrário do RUN2 que apresentou o menor conteúdo em flavonoides totais (valores inferiores a 1,23 mg QE/g amostra seca). Este facto leva a concluir que o conteúdo em flavonoides totais depende fortemente das condições edafoclimáticas a que cada planta está sujeita.

Por outro lado, os extratos aquosos a 95°C mostraram a maior capacidade de extração em flavonoides totais (1,23 a 2,38 mg QE/g amostra seca). Nas plantas cultivadas, os extratos metanólicos (valores de 0,51 a 0,59 mg QE/g amostra seca) e aquosos a 25°C (0,33 a 0,74 mg QE/g amostra seca) não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre si. Estes conteúdos em flavonoides totais estão de acordo com os relatados previamente por Gudej & Tomczyk (2004), que apresentou concentrações em flavonoides totais em extratos metanólicos de 0,49 e 0,35 mg QE/g amostra seca em *Rubus ulmifolius* Schott não cultivada e cultivada, respetivamente, e com os de Trabelsi *et al.* (2010) que apresentou conteúdo em

flavonoides totais de 1,07, 0,17 e 4,2 mg QE/g amostra seca para extratos aquosos, etanólicos e metanólicos, respetivamente.

A correlação entre fenólicos totais e flavonoides totais foi significativamente baixa ($R^2=0,311$). Este resultado indica que além dos flavonoides, existem outros compostos fenólicos (ácidos fenólicos, entre outros) nestas folhas de *Rubus* (Tabela 9). Contudo, os conteúdos em flavonoides presentes nos extratos de folhas estudados indicam que estas plantas possuem múltiplos efeitos positivos na saúde humana, devido à ação antioxidante e eliminadora de radicais livres destes compostos. Estudos anteriores (Martínez-Flórez *et al.*, 2002) indicam que os flavonoides apresentam ação pró-oxidante, constatando-se, na maioria das investigações, a existência de efeitos anti-inflamatórios, antivirais e antialérgicos, assim como o seu papel protetor contra doenças cardiovasculares, cancro e outras patologias.

Conteúdo em antocianinas monoméricas totais

O conteúdo em antocianinas monoméricas totais foi estimado pelo método de pH-diferencial descrito por Giusti & Wrolstad (2001). Os resultados obtidos para os diferentes extratos de folhas de *Rubus* estudados foram apresentados na Tabela 8. A RUN1 exibiu os maiores conteúdos em antocianinas (concentrações entre 1,05 e 3,29 mg antocianinas/g amostra seca), seguida da RIC (valores entre 0,18 e 2,48 mg antocianinas/g amostra seca) e RUC (concentrações de 0,17 a 2,10 mg antocianinas/g amostra seca). Os conteúdos em antocianinas mais baixos foram apresentados pelo RUN2 (concentrações inferiores a 0,53 mg antocianinas/g amostra seca), não se verificando diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os quatro extratos estudados neste espécime. Resultados similares foram observados por Wang *et al.* (2000) em várias plantas de *Rubus*. Mais uma vez se conclui, que a região de cultivo da planta influencia fortemente o seu conteúdo em fitonutrientes, uma vez que os dois espécimes não cultivados de *Rubus ulmifolius* Schott estudados neste trabalho apresentam concentrações em antocianinas significativamente diferentes.

No que diz respeito aos diferentes solventes usados nas extrações, os que apresentaram a maior capacidade de extração de antocianinas totais foram a água 95°C e o metanol, não se verificando diferenças significativas entre estes dois extratos. No entanto, no RUC, o extrato metanólico distingue-se significativamente dos restantes extratos. Por outro lado, o etanol foi o solvente que mostrou um poder de extração de antocianinas mais baixo (valores inferiores a 1,05 mg antocianinas/g amostra seca). Assim, estes resultados sugerem que para a extração de antocianinas totais, é de grande importância e necessária um estudo sobre o solvente mais apropriado, nomeadamente, no que diz respeito à sua polaridade.

O baixo coeficiente de correlação ($R^2=0,237$) obtido entre o conteúdo em antocianinas monoméricas totais e o conteúdo em fenólicos totais, assim como a correlação negativa ($R^2 = -0,091$) obtida entre o conteúdo em antocianinas totais e o conteúdo em flavonoides totais indica que a maioria dos flavonoides e fenólicos existentes nestes extratos são outros (quercetina, catequina, canferol, entre outros) que não as antocianinas.

Estudos recentes demonstram que as antocianinas atuam como antioxidantes naturais, promovendo vários benefícios na saúde (Jacques & Zambiasi, 2011). Segundo Garzón *et al.* (2009), as antocianinas podem ser potenciais fontes de corantes naturais e nutraceuticos. Desta forma, e após análise dos resultados obtidos, sugere-se que os extratos de folhas de *Rubus* estudados possuem potencial comercial para aplicações em novos produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentares.

Conteúdo em taninos condensados

O conteúdo em taninos condensados (proantocianidinas) mostrou variações significativas que dependem do solvente de extração e da planta estudada (Tabela 8), à semelhança do conteúdo em fenólicos totais e flavonoides totais. Os extratos metanólicos apresentam, em geral, as quantidades mais elevadas de taninos condensados (as concentrações variaram de 3,67 a 13,49 mg CE/g amostra seca). No entanto, nas duas plantas não cultivadas não se verificaram diferenças significativas entre os extratos aquosos a 95 °C, etanólicos e metanólicos. É de referir também que nestas plantas, os extratos etanólicos e metanólicos obtiveram os melhores resultados, em comparação com os extratos aquosos. Alguns compostos hidrofílicos são mais facilmente extraídos com água do que com solventes orgânicos, e o inverso acontece com os hidrofóbicos.

Por outro lado, os extratos de RUC e RIC apresentaram os conteúdos mais elevados em taninos condensados, principalmente nos extratos orgânicos (as concentrações variaram de 2,03 a 13,49 mg CE/g amostra seca e de 1,79 a 6,99 mg CE/g amostra seca em RUC e RIC, respetivamente). Os dois espécimes não cultivados (RUN1 e RUN2) apresentaram os teores mais baixos de taninos condensados (concentrações inferiores a 4,49 e a 3,67 mg CE/g amostra seca, respetivamente). Estes dados são corroborados por Trabelsi *et al.* (2010), o qual mostra que as proantocianidinas em plantas são extraídas mais facilmente com metanol, relativamente à água e ao etanol. Por outro lado, os valores relatados por este autor (0,46, 0,36 e 1,37 mg CE/g amostra seca para extratos aquosos, etanólicos e metanólicos, respetivamente) são bastante inferiores aos obtidos neste estudo, o que leva a concluir que os extratos estudados neste trabalho são fontes ricas em taninos condensados. Estes compostos

são conhecidos pelos seus efeitos benéficos na saúde, nomeadamente efeitos antioxidantes, antimicrobianos, anti-inflamatórios, antivirais, anticancerígenos, adstringentes (Gudej & Tomczyk, 2004), cardioprotectores e vasodilatadores (Trabelsi *et al.*, 2010).

Assim, estes resultados sugerem que as folhas de *Rubus* analisadas neste estudo apresentam forte potencial para múltiplas aplicações na indústria alimentar, cosmética, farmacêutica e tratamentos medicinais.

Tabela 8. Conteúdo em compostos fenólicos de diferentes extratos de folhas de *Rubus*.

Extratos	Fenólicos	Flavonoides	Antocianinas	Taninos
RUN 1				
Aquoso (25 °C)	7,08 ± 0,63 ^{de}	0,45 ± 0,03 ^{ij}	2,56 ± 0,24 ^{cd}	1,90 ± 0,07 ^{gh}
Aquoso (95 °C)	11,82 ± 0,56 ^b	1,23 ± 0,01 ^{cd}	3,06 ± 0,16 ^a	3,07 ± 0,04 ^{egh}
Etanólico	1,30 ± 0,18 ⁱ	0,62 ± 0,03 ^{gi}	1,05 ± 0,12 ^f	3,22 ± 0,17 ^{egh}
Metanólico	4,48 ± 0,23 ^g	0,97 ± 0,01 ^{fe}	3,29 ± 0,23 ^{ab}	4,49 ± 0,22 ^{de}
RUN 2				
Aquoso (25 °C)	9,26 ± 0,35 ^c	0,76 ± 0,01 ^{gfh}	0,43 ± 0,02 ^g	2,62 ± 0,11 ^{fgh}
Aquoso (95 °C)	15,09 ± 0,36 ^a	1,87 ± 0,02 ^b	0,48 ± 0,01 ^g	3,48 ± 0,14 ^{ge}
Etanólico	2,76 ± 0,08 ^h	1,03 ± 0,02 ^{de}	0,32 ± 0,01 ^g	3,15 ± 0,14 ^{ge}
Metanólico	4,95 ± 0,16 ^g	1,76 ± 0,03 ^b	0,53 ± 0,02 ^g	3,67 ± 0,30 ^{ef}
RUC				
Aquoso (25 °C)	5,29 ± 0,22 ^{fg}	0,33 ± 0,05 ^j	1,19 ± 0,04 ^f	2,03 ± 0,05 ^{gh}
Aquoso (95 °C)	7,76 ± 0,17 ^d	2,38 ± 0,05 ^a	1,19 ± 0,03 ^f	2,33 ± 0,81 ^{fgh}
Etanólico	1,03 ± 0,07 ⁱ	1,38 ± 0,04 ^c	0,17 ± 0,00 ^g	8,90 ± 0,54 ^b
Metanólico	6,43 ± 0,31 ^e	0,51 ± 0,18 ^{fhi}	2,10 ± 0,15 ^{ce}	13,49 ± 0,70 ^a
RIC				
Aquoso (25 °C)	6,20 ± 0,32 ^{ef}	0,74 ± 0,13 ^{gfh}	1,73 ± 0,08 ^e	1,79 ± 0,17 ^h
Aquoso (95 °C)	7,14 ± 0,69 ^{de}	1,69 ± 0,09 ^b	2,03 ± 0,07 ^{ce}	2,06 ± 0,20 ^{gh}
Etanólico	0,71 ± 0,03 ⁱ	1,04 ± 0,03 ^{de}	0,18 ± 0,01 ^g	5,68 ± 1,19 ^{cd}
Metanólico	4,56 ± 0,12 ^g	0,59 ± 0,17 ^{hi}	2,48 ± 0,13 ^{bd}	6,99 ± 0,78 ^c

Nota: Os resultados são a média ± desvio padrão (n = 3). O conteúdo em fenólicos totais foi expresso em mg de GAE/g de amostra seca. O conteúdo em flavonoides totais foi expresso em mg QE/g de amostra seca, o conteúdo em antocianinas monoméricas totais foi expresso em mg antocianinas/g amostra seca e o conteúdo em taninos condensados foi expresso em mg de CE/g amostra seca. Os valores com diferentes letras, na mesma coluna, são significativamente diferentes (p < 0,05).

Identificação de compostos fenólicos por HPLC-DAD

Os fenólicos existem nas plantas principalmente na forma de agliconas, glicosídeos ou ésteres e são essenciais no crescimento e reprodução dos vegetais, além de atuarem como agentes anti patogênicos e contribuírem na sua pigmentação. Neste estudo foram identificados com sucesso dezanove compostos fenólicos nas diferentes folhas analisadas, de acordo com o tempo de retenção e as características espectrais, usando RP-HPLC equipado com um detetor fotodiodo. O perfil de compostos fenólicos das folhas de *Rubus* analisadas é mostrado na Tabela 9.

Os cromatogramas dos diferentes extratos permitiram identificar 3 flavonóis (quercetina, miricetina e canferol), 2 catequinas ((+) catequina e (-) epicatequina), 6 antocianinas (cianidina 3, cianidina3,5, delphinidina3, delphinidina 3,5, pelargonidina 3 e pelargonidina 3,5), 4 ácidos hidroxicinâmicos (ácido clorogênico, sinápico, cafeico e cumárico) e 4 ácidos hidroxibenzóicos (ácido gálico, anísico, benzoico e gentísico).

Os três flavonóis foram detetados em todas as amostras estudadas, no entanto o canferol foi o que apresentou os maiores conteúdos (valores de 0,21 a 0,78 mg/g), em comparação com os baixos conteúdos de quercetina e miricetina. Gudej & Tomczyk (2004) reporta valores de canferol mais baixos para *Rubus idaeus* L. e *Rubus ulmifolius* Schott (0,18 e 0,20, respetivamente). O canferol é conhecido pelas suas atividades neuroprotetora, antidiabética, analgésica, antialérgica, entre outras.

Das duas catequinas identificadas, a (+) catequina foi detetada em todas as amostras e o maior conteúdo foi apresentado pela RUC (0,58 mg/g). As catequinas presentes em vegetais têm sido consideradas agentes terapêuticos, devido aos seus efeitos benéficos na saúde, tais como a sua suposta proteção contra alguns tipos de cancro, doenças cardiovasculares e o envelhecimento (Carvalho *et al.*, 2011).

Relativamente às antocianinas, a cianidina 3,5 foi detetada nas quatro amostras estudadas e a maior concentração foi apresentada pela RUN1 (0,46 mg/g). A pelargonidina 3,5 foi detetada, apresentando elevadas concentrações (valores entre 1,00 e 1,42 mg/g). Estas antocianinas possuem agentes radioprotetores e quimioprotetores.

No que diz respeito aos ácidos hidroxicinâmicos, os ácidos cumárico e cafeico foram identificados em todas as folhas de *Rubus* analisadas e os maiores conteúdos foram apresentados pela RUN2 (1,90 mg/g). Dos quatro ácidos hidroxibenzóicos detetados, o ácido anísico foi encontrado em todas as amostras analisadas (conteúdos entre 0,11 e 0,53 mg/g) e o ácido gálico encontrado em três amostras estudadas. O espécime não cultivado do

Alentejo (RUN1) mostrou uma elevada concentração neste ácido (3,46 mg/g), relativamente à RUC e RIC (0,16 e 0,22 mg/g, respetivamente).

Na verdade, a elevada correlação entre o conteúdo em fenólicos totais e a atividade antioxidante encontrada nestas plantas pode ser explicada pela presença destes compostos maioritários. Estudos anteriores indicaram que estes benzoatos são agentes antioxidantes fortes, reduzem radicais e peróxidos de hidrogénio (Trabelsi *et al.*, 2010). Os antioxidantes naturais como os polifenóis são interessantes tanto para os investigadores alimentares como para os profissionais de saúde. Os antioxidantes têm sido adicionados a alimentos para estabilizá-los mas também tem sido expresso um interesse considerável pelas suas funções como agentes terapêuticos. Os ácidos fenólicos como o ácido gálico, anísico e cumárico estão associados a propriedades organoléticas, nutricionais e antioxidantes de alimentos.

Os antioxidantes atuam como constituintes endógenos ou são adicionados para melhorar a qualidade de produtos. O mecanismo pelo qual estes compostos atuam é por redução dos radicais livres com doação de um eletrão ou de um átomo de hidrogénio, ou por desativação de iões metálicos. O ácido gálico, anísico e cafeico têm sido bastante usados como aditivos para evitar a degradação da comida e são conhecidos por possuírem atividade anti-inflamatória, anticancerígena e anti mutagénica, enquanto o ácido cumárico apresenta atividade antimicrobiana e antimicótica.

Os resultados sugerem que os flavonóis como o canferol e as catequinas, juntamente com os ácidos hidroxicinâmicos (ácido cumárico) e ácidos hidroxibenzóicos (ácido gálico) desempenham um papel fundamental no crescimento das folhas de *Rubus*. Neste sentido, é possível afirmar que a extração seletiva de moléculas bioativas a partir de fontes naturais como as folhas analisadas neste estudo, é importante para obter frações com elevada atividade biológica, as quais podem ser usadas como ingredientes conservantes nos alimentos e/ou na indústria farmacêutica.

Tabela 9. Concentrações de compostos fenólicos determinados por HPLC de extratos de folhas de *Rubus*.

Compostos	RUN 1	RUN 2	RUC	RIC
Flavonóis				
Quercetina	0,12 ± 0,00 ^b	0,04 ± 0,00 ^c	0,12 ± 0,00 ^b	0,43 ± 0,00 ^a
Miricetina	0,02 ± 0,00 ^c	0,23 ± 0,00 ^b	0,07 ± 0,00 ^c	0,66 ± 0,00 ^a
Canferol	0,31 ± 0,14 ^c	0,21 ± 0,00 ^c	0,78 ± 0,00 ^a	0,64 ± 0,00 ^b
Total	0,45	0,48	0,97	1,73
Catequinas				
(+)-Catequina	0,02 ± 0,00 ^b	0,04 ± 0,00 ^b	0,58 ± 0,00 ^a	0,08 ± 0,00 ^b
(-) -Epicatequina	0,02 ± 0,01 ^b	ND	0,01 ± 0,00 ^b	0,10 ± 0,00 ^a
Total	0,04	0,04	0,59	0,18
Antocianinas				
Cy 3	1,10 ± 0,00 ^a	ND	0,09 ± 0,00 ^c	0,42 ± 0,00 ^b
Cy 3,5	0,11 ± 0,00 ^c	0,46 ± 0,31 ^a	0,23 ± 0,00 ^b	0,12 ± 0,00 ^c
Dp 3	0,32 ± 0,00 ^a	0,11 ± 0,00 ^c	0,20 ± 0,00 ^b	0,18 ± 0,00 ^b
Dp 3,5	0,17 ± 0,00 ^a	ND	0,15 ± 0,00 ^a	0,19 ± 0,00 ^a
Pg 3	0,17 ± 0,00 ^b	ND	0,34 ± 0,00 ^a	0,16 ± 0,00 ^b
Pg 3,5	1,42 ± 0,00 ^a	ND	1,00 ± 0,00 ^b	1,41 ± 0,00 ^a
Total	2,99	0,57	2,01	2,48
Ácidos hidroxicinâmicos				
Ácido cumárico	0,09 ± 0,03 ^b	1,90 ± 0,03 ^a	0,07 ± 0,00 ^b	0,12 ± 0,00 ^b
Ácido cafeico	0,02 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	0,02 ± 0,00 ^a
Ácido clorogénico	ND	ND	0,04 ± 0,00 ^a	0,01 ± 0,00 ^a
Ácido sinápico	0,34 ± 0,00 ^a	ND	0,01 ± 0,00 ^b	ND
Total	0,45	1,93	0,15	0,15
Ácidos hidroxibenzóicos				
Ácido gálico	3,46 ± 0,18 ^a	ND	0,16 ± 0,00 ^b	0,22 ± 0,00 ^b
Ácido benzoico	ND	ND	0,06 ± 0,00 ^a	0,01 ± 0,00 ^a
Ácido gentísico	0,10 ± 0,00 ^a	ND	0,03 ± 0,00 ^b	ND
Ácido anísico	0,33 ± 0,01 ^b	0,11 ± 0,00 ^c	0,53 ± 0,00 ^a	0,37 ± 0,00 ^b
Total	3,89	0,11	0,78	0,60

Nota: Os resultados são a média ± desvio padrão (n=3) e são expressos em mg/g amostra seca. Os valores com diferentes letras, na mesma linha, são significativamente diferentes (p <0,05). ND, não detetado.

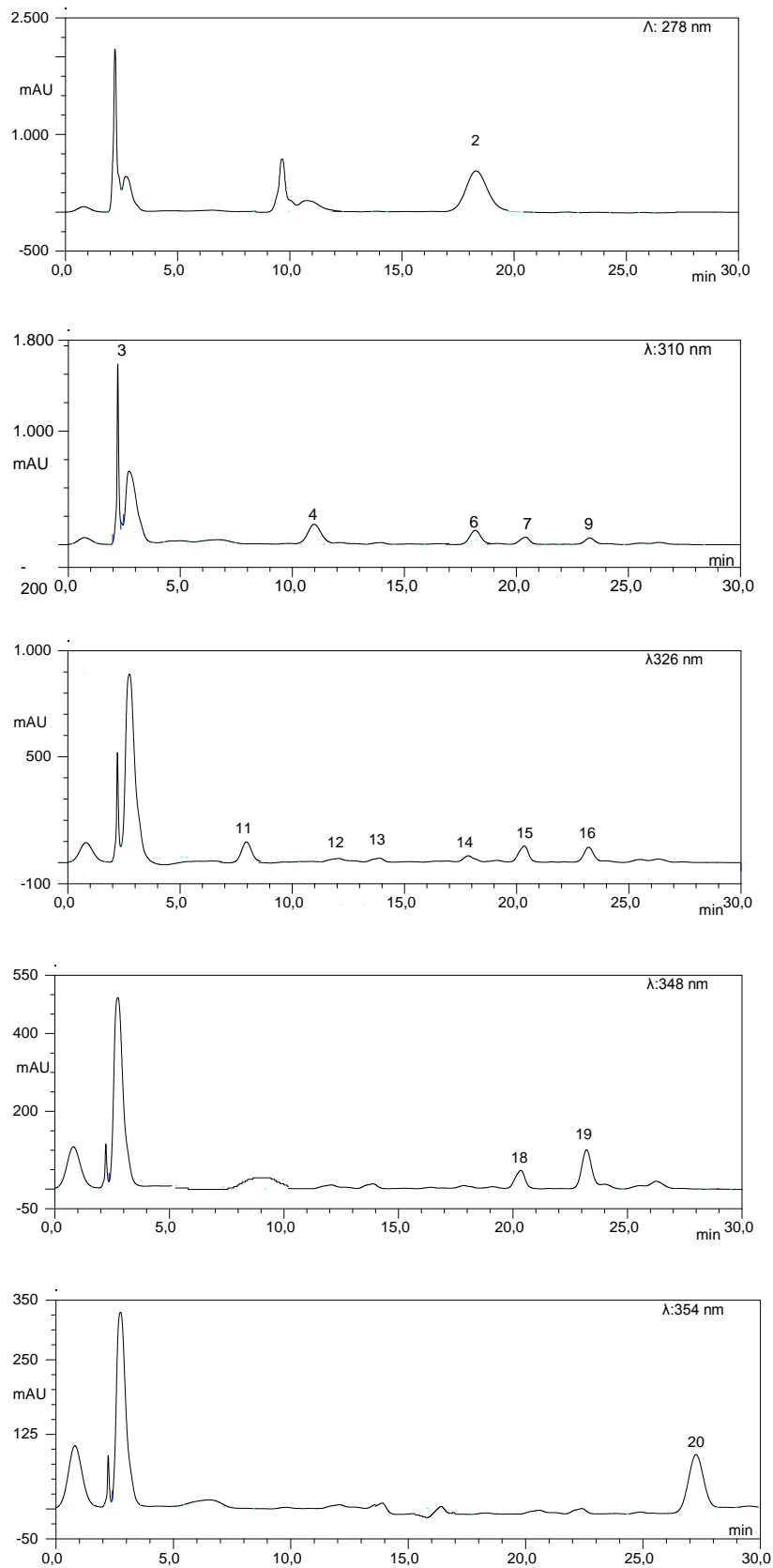


Figura 13. Cromatogramas de HPLC-DAD a 278, 310, 326, 348 e 354 nm de compostos fenólicos de folhas da espécie RUN1 (*Rubus ulmifolius* Schott). Picos: 1 – catequina; 2- epicatequina; 3- ácido gálico; 4-ácido gentísico; 6- ácido cumárico; 7- ácido sinápico; 9- ácido anísico; 11- delphinidina 3,5- diglucosido; 12 – cianidina 3,5- diglucosido; 13 – pelargonidina 3,5-diglucosido; 14 – delphinidina 3-glucosido; 15 – cianidina 3-glucosido; 16 – pelargonidina 3- glucosido; 18 – canferol; 19 – miricetina; 20 – quercetina.

3.2.2.2 Conteúdo em ácido ascórbico

Os vários extratos de *Rubus* analisados neste estudo apresentaram um alto teor em ácido ascórbico, variando os valores de 0,19 a 2,23 mg AAE/g amostra seca (Tabela 10). Depois de se observarem os resultados obtidos conclui-se que a RUN1 apresenta os maiores conteúdos em ácido ascórbico (1,10 a 2,23 mg AAE/g amostra seca). Notou-se, além disso, que os dois espécimes não cultivados mostraram concentrações de ácido ascórbico mais elevadas do que a RUC e RIC. Esta última apresentou os resultados mais baixos e não se verificaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os quatro extratos avaliados nesta planta. Garzón *et al.* (2009) reportou valores de ácido ascórbico que variavam de 0,14 a 0,32 mg AAE/g amostra seca para *Rubus idaeus* L. e *Rubus ulmifolius* Schott em extratos aquosos. Estes resultados são um pouco mais baixos, relativamente aos obtidos neste estudo e estas diferenças podem ser devidas a diferenças nas regiões de cultivo e nas condições de extração.

Relativamente aos diferentes solventes usados nas extrações, verificou-se que os extratos aquosos a 95°C foram os que apresentaram a maior capacidade de extrair ácido ascórbico, ainda que não se tenham observado diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estes extratos e os metanólicos (Tabela 10). Vejamos o exemplo do espécime RUC, que apesar do valor da extração metanólica ser ligeiramente maior (1,44 mg AAE/g amostra seca), não se verificaram diferenças significativas entre estes extratos e os aquosos a 95°C (1,08 mg AAE/g amostra seca). Isto sugere que, neste caso, não se justifica o uso do solvente orgânico, pois este solvente requer cuidados específicos de manuseamento, uma vez que possui efeitos prejudiciais para a saúde, enquanto a água é de fácil manipulação. Por outro lado, os extratos etanólicos mostraram os valores mais baixos de ácido ascórbico (inferiores a 1,10 mg AAE/g amostra seca).

Noutras espécies estudadas por Jung *et al.* (2006), os conteúdos observados de ácido ascórbico também foram inferiores aos observados neste estudo (0,57, 0,22 e 0,15 mg AAE/g amostra seca para o mesmo tipo de extratos aquosos, etanólicos e metanólicos, respetivamente). Com estes resultados conclui-se que as plantas de *Rubus* estudadas apresentam uma alta atividade antioxidante, uma vez que o ácido ascórbico possui fortes propriedades antioxidantes.

3.2.2.3 Atividade antioxidante

Atividade antioxidante total (TAA)

A escolha deste teste para avaliação da atividade antioxidante deve-se ao facto deste possuir uma metodologia de baixo custo, fácil manipulação e, segundo os autores, poder ser utilizado com diferentes solventes e possuir alta capacidade de avaliação da atividade antioxidante. Os vários extratos das diferentes plantas de *Rubus* analisadas apresentaram elevada atividade antioxidante (os valores variaram de 1,56 a 14,32 mg AAE/g amostra seca) e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 10.

A RUN2 foi a que apresentou a maior atividade antioxidante (valores de 5,66 a 14,32 mg AAE/g amostra seca). Além disso, os dois espécimes não cultivados (*Rubus ulmifolius* Schott) apresentaram os melhores resultados, quando comparadas com as plantas cultivadas (valores de 2,23 a 6,13 mg AAE/g amostra seca e de 1,56 a 5,57 mg AAE/g amostra seca na RUC e na RIC, respetivamente).

Relativamente aos diferentes solventes analisados nas extrações, verificou-se que os extratos aquosos a 95°C foram os que apresentaram a maior capacidade de extração (maior capacidade de redução de molibdénio VI a molibdénio V), seguidos dos extratos metanólicos. Por outro lado, o etanol mostrou ser o solvente com menor poder de extração de antioxidantes totais. Com estes resultados é possível verificar o efeito do solvente na capacidade de extração de antioxidantes. Vários estudos (Trabelsi *et al.*, 2010) mostram que a extração de antioxidantes difere com as polaridades dos solventes. Estudos prévios afirmam que extratos a partir do mesmo material vegetal, usando diferentes solventes, podem variar amplamente no que diz respeito às suas concentrações e atividades antioxidantes. Neste contexto, este autor afirma que a água é o melhor solvente para extração de antioxidantes, em comparação com o metanol e o etanol. Assim, a solubilidade dos antioxidantes depende do tipo de solvente, do grau de polimerização e da formação de complexos insolúveis.

Para concluir, é possível afirmar que os extratos analisados neste estudo são fontes ricas de antioxidantes naturais, podendo ter o mesmo valor nutricional de espécies que têm sido caracterizadas por possuírem propriedades terapêuticas.

Poder redutor (RP)

A capacidade dos vários extratos analisados para reduzir o Fe^{3+} (ião ferricianeto) foi analisada pelo método de Oyaizu (1986). A Tabela 10 mostra os resultados obtidos de poder redutor para os vários extratos estudados. Em geral, observou-se um elevado poder de redução das amostras, variando os valores de 0,52 a 18,88 mg TE/g amostra seca. O maior poder redutor foi observado no RUN2 (os valores variam de 4,49 a 18,88 mg TE/g amostra seca), o que seria de esperar uma vez que este espécime foi o que também apresentou maior conteúdo em fenólicos totais e são estes os responsáveis pela redução do Fe^{3+} . Verificou-se ainda que os espécimes não cultivados apresentam maior poder redutor do que os cultivados (valores inferiores a 5,47 mg TE/g amostra seca). Contudo, no espécime RUC, não se verificaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os extratos aquosos (25 e 95°C) e os metanólicos.

Por outro lado, os resultados indicam que os extratos aquosos a 95°C (concentrações entre 4,88 e 18,88 mg TE/g amostra seca) apresentam o maior poder redutor e os extratos etanólicos (valores inferiores a 4,49 mg TE/g amostra seca) mostraram o menor poder redutor. Estes resultados indicam que o extrato aquoso a 95°C (que também apresentou maior conteúdo em fenólicos totais) teve o melhor impacto sobre a atividade antioxidante. Isto demonstra que, para os extratos analisados, o sistema solvente influencia a composição de substâncias presentes com atividade antioxidante. Estas observações sugerem que tanto a polaridade do solvente como a natureza fenólica da planta influencia fortemente a estimativa da atividade antioxidante.

Tabela 10. Conteúdo em fenólicos totais, ácido ascórbico e atividade antioxidante de extratos de folhas de *Rubus*.

Extratos	Fenólicos	Ácido ascórbico	TAA	RP
RUN 1				
Aquoso (25° C)	7,08 ± 0,63 ^{de}	1,40 ± 0,17 ^{bc}	5,81 ± 0,73 ^{cde}	8,08 ± 0,64 ^d
Aquoso (95° C)	11,82 ± 0,56 ^b	2,22 ± 0,37 ^a	10,68 ± 1,26 ^b	15,47 ± 0,49 ^b
Etanólico	1,30 ± 0,18 ⁱ	1,10 ± 0,10 ^{bce}	2,24 ± 0,13 ^{gh}	2,10 ± 0,07 ^{gh}
Metanólico	4,48 ± 0,23 ^g	2,23 ± 0,32 ^a	7,70 ± 0,27 ^c	11,82 ± 0,24 ^c
RUN 2				
Aquoso (25° C)	9,26 ± 0,35 ^c	1,24 ± 0,26 ^{bcd}	10,56 ± 1,43 ^b	12,75 ± 2,53 ^c
Aquoso (95° C)	15,09 ± 0,36 ^a	1,47 ± 0,23 ^b	13,58 ± 0,54 ^a	18,88 ± 1,05 ^a
Etanólico	2,76 ± 0,08 ^h	0,77 ± 0,23 ^{ceg}	3,21 ± 0,57 ^{fgh}	4,49 ± 0,45 ^{ef}
Metanólico	4,95 ± 0,16 ^g	1,13 ± 0,11 ^{bce}	5,66 ± 0,16 ^{de}	6,37 ± 0,06 ^{de}
RUC				
Aquoso (25° C)	5,29 ± 0,22 ^{fg}	0,94 ± 0,06 ^{bce}	4,61 ± 0,65 ^{def}	5,26 ± 0,22 ^e
Aquoso (95° C)	7,76 ± 0,17 ^d	1,08 ± 0,08 ^{bce}	6,13 ± 0,30 ^{cd}	5,47 ± 0,08 ^e
Etanólico	1,03 ± 0,07 ⁱ	0,53 ± 0,25 ^{efh}	2,23 ± 0,10 ^{gh}	1,51 ± 0,34 ^h
Metanólico	6,43 ± 0,31 ^e	1,44 ± 0,16 ^b	5,40 ± 0,75 ^{de}	5,45 ± 0,09 ^e
RIC				
Aquoso (25° C)	6,20 ± 0,32 ^{ef}	0,68 ± 0,13 ^{defg}	4,04 ± 0,43 ^{eg}	4,37 ± 0,05 ^{eg}
Aquoso (95° C)	7,14 ± 0,69 ^{de}	0,61 ± 0,19 ^{defg}	5,47 ± 0,38 ^{de}	4,88 ± 0,15 ^{ef}
Etanólico	0,71 ± 0,03 ⁱ	0,19 ± 0,07 ^{gh}	1,56 ± 0,15 ^h	0,52 ± 0,02 ^h
Metanólico	4,56 ± 0,12 ^g	0,86 ± 0,12 ^{bcf}	2,91 ± 0,13 ^{fgh}	2,54 ± 0,07 ^{fgh}

Nota: Os resultados são a média ± desvio padrão (n=3). O conteúdo em fenólicos totais são expressos em mg GAE/g amostra seca e o conteúdo em ácido ascórbico são expressos em mg AAE/g amostra seca. A atividade antioxidante total foi expressa em mg AAE/g amostra seca e o poder redutor foi expresso em mg TE/g amostra seca. Os valores com diferentes letras, na mesma coluna, são significativamente diferentes (p < 0,05).

A atividade antioxidante de extratos de plantas depende largamente da composição dos extratos e das condições dos métodos. Esta atividade é influenciada por vários fatores, os quais não podem ser descritos com um único método. Assim, é necessário realizar mais do que um tipo de teste para se poder ter em conta os vários mecanismos de ação antioxidante. Neste estudo, os diferentes extratos de folhas de *Rubus* foram avaliados relativamente à sua atividade antioxidante, usando os ensaios FRAP, ABTS e DPPH.

Ensaio FRAP

Este método é versátil e pode ser facilmente aplicado tanto em extratos aquosos como em extratos alcoólicos (Li *et al.*, 2008). Neste ensaio, a atividade antioxidante é avaliada com base na habilidade de reduzir o íão ferro (III) a íão ferroso (II) e os resultados são expressos em mg equivalentes de Trolox/g amostra seca. A Tabela 11 mostra a atividade antioxidante dos diferentes extratos de folhas de *Rubus* estudados, usando o ensaio FRAP. As amostras, em geral, mostraram uma elevada atividade antioxidante, tendo as concentrações variado de 0,53 a 7,25 mg TE/g amostra seca. Neste ensaio, a RUC foi a que apresentou uma maior atividade antioxidante (valores entre 1,41 e 7,25 mg TE/g amostra seca). Os dados revelam também que as amostras cultivadas apresentam uma maior atividade antioxidante, quando comparadas com as não cultivadas.

A partir dos dados obtidos, observou-se que a utilização de diferentes solventes influencia o poder redutor da amostra a ser analisada. Segundo Pulido *et al.* (2000) a eficiência antioxidante determinada pelo método FRAP depende do potencial redox dos compostos analisados, caracterizado pela complexidade de suas moléculas. Verificou-se que os extratos aquosos a 95°C e metanólicos foram os que apresentaram a maior atividade antioxidante, isto é, maior capacidade de redução do ferro (III), ao passo que os extratos etanólicos mostraram a menor atividade antioxidante. No entanto, na RUN1 não se verificaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os extratos aquosos (25 e 95°C) e os metanólicos (Tabela 11). Por outro lado, os dois espécimes não cultivados apresentam diferenças significativas nos extratos etanólicos e metanólicos, o que permite concluir que a atividade antioxidante dos espécimes é fortemente influenciada pela sua região de cultivo, uma vez que a mesma espécie não cultivada (*Rubus ulmifolius* Schott) apresenta valores significativamente diferentes em função do seu local de crescimento. Com estes dados, pôde concluir-se que as plantas com maior atividade antioxidante são, assim, uma valiosa fonte de antioxidantes naturais para isolamento e purificação de componentes antioxidantes.

Ensaio ABTS

O método ABTS foi usado para determinar a atividade antioxidante dos vários extratos analisados neste trabalho. O ensaio de descoloração do radical ABTS^{•+} é um dos mais comumente utilizados na avaliação da atividade antioxidante e mede a habilidade dos compostos para reduzirem o radical ABTS^{•+}. Este método é recomendado por ser usado em extratos vegetais devido às suas características de absorção máxima a 734 nm que elimina a interferência da cor nos extratos vegetais (Li *et al.*, 2008).

A Tabela 11 mostra a atividade antioxidante dos diferentes extratos de folhas de *Rubus* estudados e os resultados foram expressos em mg TE/g amostra seca. As amostras, em geral, apresentaram uma elevada atividade antioxidante, variando as concentrações de 0,89 a 34,80 mg TE/g amostra seca. Os espécimes não cultivados foram os que mostraram uma atividade antioxidante mais elevada (concentrações que variam de 3,93 a 34,80 mg TE/g amostra seca e de 2,05 a 16,31 mg TE/g amostra seca nos espécimes RUN2 e RUN1, respectivamente), seguidos da RUC (valores de 1,85 a 8,20 mg TE/g amostra seca). Em contraste, *Rubus idaeus* L. (RIC) apresentou a atividade antioxidante mais baixa (concentrações inferiores a 5,76 mg TE/g amostra seca).

Amensour *et al.* (2010) relatou concentrações de 2,4, 0,31 e 2,59 mg TE/g amostra seca para extratos aquosos, etanólicos e metanólicos, respectivamente, com características de extração idênticas. Estes valores estão de acordo com os obtidos neste estudo. Os resultados obtidos neste teste evidenciam o potencial dos espécimes não cultivados como fortes fontes de nutrientes e antioxidantes naturais.

Estes resultados mostraram que a capacidade de reduzir o radical ABTS^{•+} depende tanto da planta estudada como do solvente usado no processo de extração. Os dois extratos aquosos (25 e 95°C) exibiram a maior capacidade de redução do radical ABTS^{•+}, seguidos pelos extratos metanólicos que também apresentaram alta capacidade de redução deste radical. Por outro lado, os extratos etanólicos mostram uma baixa capacidade para reduzir este mesmo radical (valores inferiores 3,93 mg TE/g amostra seca). Foram obtidos alguns resultados similares entre os dois tipos de extratos aquosos, sugerindo que estes extratos exercem os seus efeitos de redução do radical a concentrações muito mais baixas, relativamente aos restantes extratos. Além disso, estes resultados sugerem ainda que os antioxidantes dos extratos etanólicos são fracos redutores do radical ABTS^{•+} e exigem concentrações mais elevadas para obterem efeitos mais significativos.

Pode afirmar-se então, que a atividade antioxidante destas plantas confere-lhe valor biológico. Conclui-se que as folhas estudadas podem contribuir significativamente para as

exigências nutricionais do homem e devem ser fontes de nutrientes complementares para outras fontes importantes.

Ensaio DPPH

Este método tem sido bastante usado para testar a habilidade de reduzir o radical livre DPPH em várias amostras. Este radical livre é estável com absorção característica de 517 nm e é usado para estudar os efeitos da redução do radical nos extratos. O efeito dos extratos neste radical deve-se à sua capacidade em doar hidrogénio, atuando possivelmente como antioxidantes primários (Jimoh *et al.*, 2010).

Com o objetivo de escolher o solvente adequado para avaliar a atividade antioxidante, foi avaliada a habilidade de redução do radical DPPH, usando os mesmos solventes. Os resultados apontaram para que os diferentes extratos de folhas do género *Rubus* possuam uma variabilidade pouco significativa ($p < 0,05$) na sua atividade de redução do radical livre DPPH, como mostra a Tabela 11. As concentrações foram expressas em mg equivalentes de Trolox/grama de amostra seca, variando de 0,13 a 0,71 mg TE/g amostra seca. Contudo, o extrato aquoso a 95 °C apresentou a maior habilidade para reduzir o radical DPPH (concentrações de 0,49 a 0,71 mg TE/g amostra seca) e a atividade anti radical mais baixa foi encontrada no extrato etanólico (valores entre 0,13 a 0,31 mg TE/g amostra seca). É de considerar ainda que os diferentes extratos estudados mostraram atividades similares na RUN1 (0,31, 0,36 e 0,38 mg TE/g amostra seca nos extratos etanólico, metanólico e aquoso a 25 °C, respetivamente) e na RUC (0,25 e 0,28 mg TE/g amostra seca no extrato etanólico e metanólico, respetivamente). Estes resultados indicam que os solventes aquosos podem ser os melhores solventes de extração para avaliar a atividade antioxidante das folhas de *Rubus*. De acordo com vários estudos (Trabelsi *et al.*, 2010), a adição de água ao solvente melhora o poder de extração e a atividade antioxidante.

Contudo, ainda assim, de entre as amostras estudadas, a RUN2 apresentou a maior atividade antioxidante (concentrações de 0,31 a 0,71 mg TE/g amostra seca).

A capacidade dos extratos para reduzir o radical ABTS foi significativamente mais alta, relativamente à sua capacidade para reduzir o radical DPPH. Fatores como a estreoseletividade dos radicais e a solubilidade dos solventes nos diferentes métodos testados, têm sido reportados (Jimoh, 2010) por afetarem a capacidade dos extratos em reagir e reduzir os diferentes radicais. Wang *et al.* (1998) descobriu que alguns compostos que possuem capacidade de reduzir o radical ABTS não possuem capacidade de reduzir o radical DPPH.

Tabela 11. Atividade antioxidante de diferentes extratos de folhas de *Rubus*.

Extratos	FRAP	ABTS	DPPH
RUN 1			
Aquoso (25° C)	2,46 ± 0,04 ^{fg}	7,40 ± 0,33 ^{de}	0,38 ± 0,02 ^{ef}
Aquoso (95° C)	2,50 ± 0,00 ^f	16,31 ± 1,38 ^c	0,49 ± 0,00 ^{cd}
Etanólico	0,77 ± 0,06 ^h	2,05 ± 0,01 ^{gh}	0,31 ± 0,01 ^{fh}
Metanólico	2,49 ± 0,04 ^f	14,67 ± 2,41 ^c	0,36 ± 0,00 ^{fg}
RUN 2			
Aquoso (25° C)	2,74 ± 0,01 ^{ef}	19,00 ± 0,23 ^b	0,44 ± 0,02 ^{de}
Aquoso (95° C)	2,73 ± 0,05 ^{ef}	34,80 ± 0,19 ^a	0,71 ± 0,00 ^a
Etanólico	2,25 ± 0,02 ^{fg}	3,93 ± 0,14 ^{fg}	0,69 ± 0,00 ^a
Metanólico	5,74 ± 0,54 ^c	7,42 ± 0,46 ^{de}	0,31 ± 0,06 ^{fh}
RUC			
Aquoso (25° C)	6,07 ± 0,19 ^{bc}	6,14 ± 0,26 ^{def}	0,47 ± 0,03 ^{cd}
Aquoso (95° C)	6,97 ± 0,39 ^{ab}	8,20 ± 0,34 ^d	0,54 ± 0,00 ^{bc}
Etanólico	1,41 ± 0,01 ^{gh}	1,85 ± 0,10 ^{gh}	0,25 ± 0,02 ^{hi}
Metanólico	7,25 ± 1,07 ^a	7,53 ± 0,49 ^{de}	0,28 ± 0,04 ^{hi}
RIC			
Aquoso (25° C)	3,64 ± 0,11 ^{de}	5,57 ± 0,29 ^{ef}	0,20 ± 0,04 ^{ij}
Aquoso (95° C)	4,29 ± 0,27 ^d	5,76 ± 0,67 ^{ef}	0,59 ± 0,00 ^b
Etanólico	0,53 ± 0,04 ^h	0,89 ± 0,09 ^h	0,13 ± 0,00 ^j
Metanólico	2,33 ± 0,10 ^{fg}	2,45 ± 0,23 ^{gh}	0,31 ± 0,00 ^{gh}

Nota: Os resultados são a média ± desvio padrão e são expressos em mg TE/g amostra seca. Os valores com diferentes letras, na mesma coluna, são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

3.2.2.4 Correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo em fenólicos totais e flavonoides totais

Os coeficientes de correlação (R^2) entre as atividades antioxidantes e o conteúdo em fenólicos totais das plantas estudadas foram determinados (Tabela 12). O R^2 entre a atividade antioxidante obtida a partir do ensaio TAA e conteúdo em fenólicos totais foi de 0,910 e o R^2 entre a atividade antioxidante obtida a partir do ensaio RP e o conteúdo em fenólicos totais foi de 0,863 (Figura 14B). Verifica-se, então, que o alto conteúdo em fenólicos é um fator importante para a determinação da atividade antioxidante destas plantas. Os resultados estão de acordo com os estudados por Ibrahim *et al.* (2010) que afirmam que os compostos fenólicos contribuem significativamente para a atividade antioxidante destas plantas.

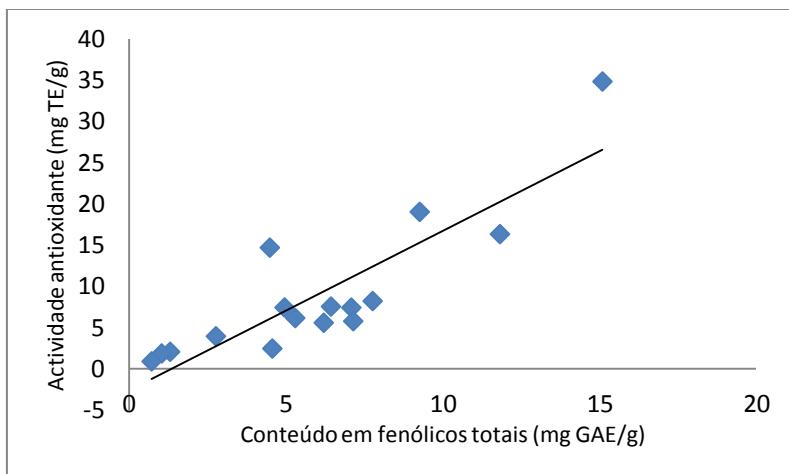
No que respeita aos métodos individuais de avaliação de atividade antioxidante, observou-se que a correlação obtida entre o conteúdo em fenólicos totais e a atividade antioxidante avaliada a partir do ensaio ABTS foi de 0,857 (Figura 14A). Estes dados estão de acordo com a pesquisa efetuada por Amensour *et al.* (2010), a qual mostra que um alto conteúdo em fenólicos totais aumenta a atividade antioxidante e que existe uma correlação linear entre o conteúdo em fenólicos e a atividade antioxidante. Este autor, reportou ainda, que o coeficiente de correlação entre a atividade antioxidante e polifenóis foi mais elevado quando o método usado para avaliar a atividade antioxidante foi o ensaio ABTS, relativamente a outros métodos, o que também foi verificado neste estudo, uma vez que o coeficiente de correlação entre o conteúdo em fenólicos e a atividade antioxidante avaliada através do método DPPH não foi tão significativa ($R^2=0,575$) como a obtida entre os valores de fenólicos e de ABTS. Isto indica que os antioxidantes não têm tanta capacidade para reduzir o radical livre DPPH como têm para reduzir o radical ABTS. Observou-se ainda que a correlação existente entre a atividade antioxidante avaliada a partir do ensaio FRAP e o conteúdo em fenólicos totais ($R^2= 0,278$) foi pouco significativa ($p < 0,05$). Este facto é um indicador de que os antioxidantes não têm tanta capacidade para reduzir os oxidantes (Fe^{3+}).

Os coeficientes de correlação entre os flavonoides totais e as atividades antioxidantes avaliadas pelos diferentes métodos foram muito menos significativos, relativamente aos coeficientes de correlação obtidos entre os fenólicos totais e os diferentes métodos de avaliação de atividade antioxidante. Estes resultados indicam que, além dos flavonoides, existem outros compostos fenólicos (ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinâmicos, entre outros) que contribuem para a atividade antioxidantes destes extratos. Estes dados sugerem ainda que os compostos fenólicos presentes nestes extratos, proporcionam atividade antioxidante

significativa e podem ser usados como indicadores importantes da atividade antioxidante destes mesmos extratos.

A figura 15 mostra ainda a forte correlação existente entre os métodos ABTS e RP ($R^2=0,938$), sugerindo que os antioxidantes presentes nestes extratos foram capazes de reduzir os radicais livres ($ABTS^{\bullet+}$) e de reduzir os oxidantes (íons férrico). Com base na elevada correlação existente entre o método ABTS e TAA ($R^2= 0,939$), pode-se concluir ainda, que a atividade antioxidante é explicada, com mais evidência, pelo método ABTS. A partir destes dados, verificou-se que as folhas de plantas de *Rubus* estudadas apresentam uma elevada atividade antioxidante. Estas plantas são, portanto, valiosas fontes de antioxidantes naturais, tanto para a preparação de extratos frescos como para um maior isolamento e purificação de componentes antioxidantes.

A



B

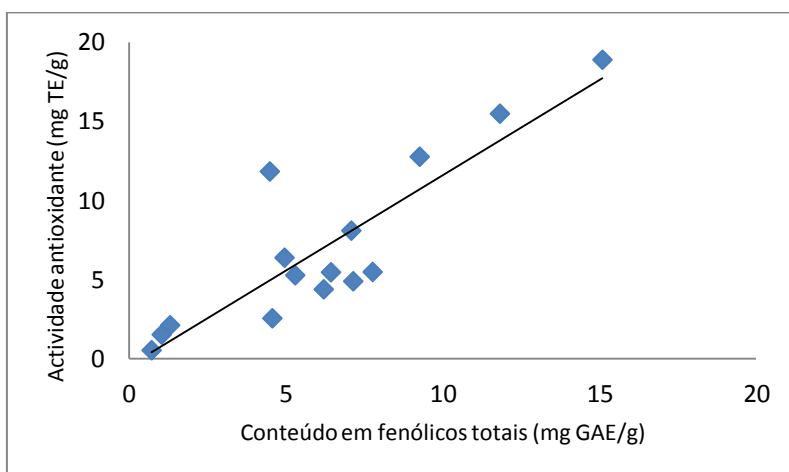


Figura 14. Correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo em fenólicos totais. A atividade antioxidante foi avaliada pelo método ABTS (A) e pelo método RP (B), respetivamente. $R^2 = 0,857$ (A) e $R^2 = 0,863$ (B).

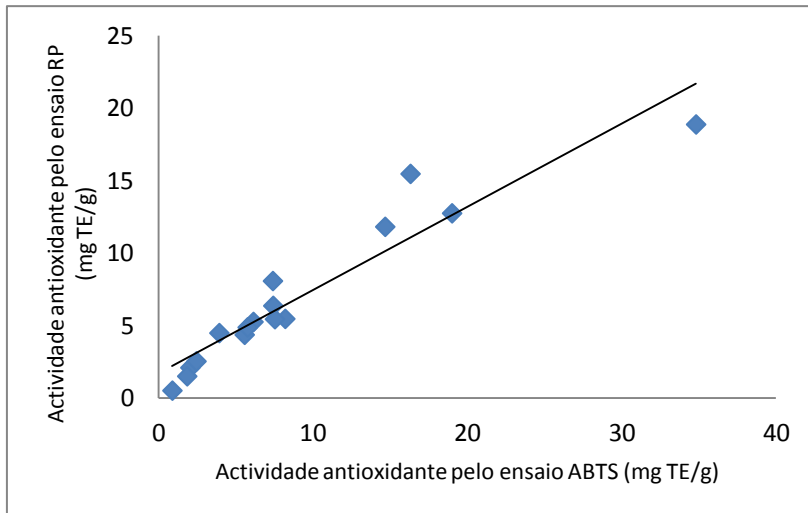


Figura 15. Correlação entre a atividade antioxidante avaliada pelos métodos ABTS e RP. $R^2=0,938$.

Tabela 12. Coeficientes de correlação (R^2) entre os diferentes métodos estudados nos extratos de folhas de *Rubus*.

	Fenólicos	Flavonoides	Antocianinas	Taninos	Ác. ascórbico	TAA	RP	FRAP	ABTS	DPPH
Fenólicos	1	0,311	0,237	-0,267	0,515*	0,910*	0,863*	0,278	0,857*	0,575*
Flavonoides		1	-0,272	-0,193	-0,022	0,300	0,215	0,213	0,305	0,413
Antocianinas			1	0,019	0,566*	0,160	0,217	0,120	0,016	-0,055
Taninos				1	-0,044	-0,247	-0,260	0,108	-0,194	-0,409
Ác. ascórbico					1	0,648*	0,727*	0,113	0,572*	0,242
TAA						1	0,964*	0,139	0,939*	0,537*
RP							1	0,032	0,938*	0,526*
FRAP								1	0,040	0,178
ABTS									1	0,534*
DPPH										1

* . Correlação significativa a $p < 0,05$.

3.2.3 Conclusão

Os resultados indicam a presença de compostos com excelente atividade antioxidante, proveniente das amostras de plantas de *Rubus* estudadas. No entanto, a RUN2 foi a que apresentou os maiores conteúdos em compostos bioativos e, conseqüentemente, a maior atividade antioxidante, pelo que merece uma especial atenção no seu estudo, uma vez que pode, potencialmente, ser uma fonte rica em antioxidantes naturais, os quais podem ter um papel importante na indústria alimentar e/ou farmacêutica. As diferenças de concentrações em compostos bioativos verificadas entre as plantas estudadas (considerando o mesmo solvente), relacionam-se, provavelmente com a variação das características edafoclimáticas de cada região.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, conclui-se que a capacidade de extração de compostos bioativos e de antioxidantes naturais depende grandemente da estereoseletividade do solvente usado no sistema de extração. Assim, verificou-se que o solvente aquoso (95 °C) se revelou o melhor solvente de extração para avaliação das amostras de plantas de *Rubus* estudadas. Estes dados poderão ser interessantes na medida em que a população em geral usa este tipo de extração (infusão) no seu quotidiano.

Os dados obtidos revelaram ainda que as correlações entre a atividade antioxidante e o conteúdo em fenólicos totais e flavonoides totais podem depender do método escolhido e das características hidrofóbicas e hidrofílicas do método e dos antioxidantes testados. Desta forma, verificou-se que as amostras estudadas contêm elevadas quantidades de compostos fenólicos e ácido ascórbico, os quais se correlacionam de uma forma bastante significativa ($p < 0,05$) com a atividade antioxidante avaliada pelo método ABTS, sugerindo que estes compostos bioativos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante apresentada por estes extratos. Por outro lado, as correlações pouco significativas ($p < 0,05$), observadas entre a atividade antioxidante avaliada pelos métodos FRAP e DPPH ($R^2=0,178$) e o conteúdo em fenólicos totais e flavonoides totais ($R^2=0,311$), sugere que os antioxidantes presentes nos extratos estudados não possuem tanta habilidade para reduzirem o radical livre DPPH e os oxidantes (ião férrico) como possuem para reduzir o radical livre ABTS^{•+}. Além disso, os ácidos fenólicos, flavonóis, catequinas e antocianinas identificados por HPLC-DAD podem contribuir fortemente para a atividade antioxidante destas plantas.

Assim, as plantas estudadas demonstram ser fontes ricas de antioxidantes naturais, que podem ser usadas na indústria alimentar, farmacêutica, cosmética, entre outras, aumentando o valor nutricional dos produtos.

4 Discussão final

Com o objetivo de estudar as características físico-químicas, o conteúdo em compostos fenólicos e a atividade antioxidante de extratos de frutos de plantas de *Rubus* obtidos no sul de Portugal, foram avaliados parâmetros de qualidade; composição em compostos fenólicos totais e individuais; e a atividade antioxidante através de diferentes métodos.

Em relação aos parâmetros físico-químicos estudados, os frutos apresentaram valores de pH (4,70, 3,30 e 3,03 para RUN2, RUC e RIC, respetivamente), de acordo com o esperado, devido às suas características naturais de sabor ácido e ácido-doce. Estes frutos mostraram valores de acidez titulável de 0,40, 1,14 e 2,21 g ácido cítrico/g amostra fresca em RUN2, RUC e RIC, respetivamente. Este parâmetro é importante na manutenção das características sensoriais dos mesmos. As amostras estudadas mostraram, ainda, valores de sólidos solúveis totais (Brix) de 15,20, 8,10 e 7,73 Brix para RUN2, RUC e RIC, respetivamente. Esta característica é um indicativo do teor de açúcares e é importante, uma vez que confere sabor agradável à fruta e aos seus produtos derivados. Teores de açúcares intermediários associados com teores adequados de acidez conferem a estes frutos características ideais para a industrialização (sumos, polpas, geleias, etc) (Hirsch, 2011).

A cor é um parâmetro importante para produtores e consumidores, pois indica se o fruto apresenta ou não condições ideais para a sua comercialização e consumo. Porém, a cor, na maioria dos casos, não contribui para o aumento efetivo do valor nutricional ou da qualidade do produto (Hirsch, 2011). Mas, em geral, os consumidores têm preferência por frutos de cor forte e brilhante. Na avaliação da cor, utilizando o método espectrofotométrico, a intensidade da cor (*CI*) foi de 2,18, 1,26 e 0,57 em RUN2, RUC e RIC, respetivamente. Quanto maior o valor de *CI*, maior a intensidade da cor da amostra. A RUN2 apresentou menor percentagem de vermelho (*Rd*) mas uma maior intensidade da cor (*CI*), em relação à RUC e RIC, o que possivelmente aumenta a sua aceitação por parte dos consumidores. A maior percentagem de azul (*Bl*) no espécime não cultivado, que lhe confere a cor púrpura (entre o vermelho e o azul), pode estar relacionada com a grande quantidade de compostos fenólicos presentes neste espécime.

No que diz respeito aos compostos bioativos presentes nos frutos de *Rubus* estudados, a RUN2 apresentou os maiores conteúdos em compostos fenólicos (fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas monoméricas totais e taninos condensados), embora a RUC e RIC tenham, ainda assim, apresentado conteúdos em compostos fenólicos semelhantes aos reportados por outros autores (Constantino *et al.*, 1992; Benvenuti *et al.*, 2004; Olszewska *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2000; Gudej & Tomczyk, 2004). Relativamente

aos diferentes solventes usados nas extrações, observou-se que os extratos aquosos a 95°C e os metanólicos se revelaram os melhores solventes de extração para avaliação dos frutos de *Rubus* estudados, ainda que a utilização de extratos aquosos a 95°C seja a melhor opção para avaliar estes frutos, uma vez que a manipulação do metanol está associada a riscos para a saúde. Este solvente apresenta efeitos de toxicidade no sistema nervoso. De acordo com Amensour *et al.* (2010), a água e o metanol são os melhores solventes de extração de compostos fenólicos em frutos, devido à sua polaridade e boa solubilidade em componentes fenólicos presentes no material vegetal.

Na avaliação dos compostos fenólicos individuais (análise HPLC-DAD) presentes nos extratos de frutos, a quercetina, o canferol, os ácidos gálico e cafeico foram os que apresentaram os teores mais elevados. Estes resultados são corroborados por Jacques & Zambiazzi, (2010), o qual relatou que os compostos fenólicos encontrados em maiores quantidades em extratos de frutos de *Rubus* foram o ácido gálico, o ácido cafeico, a quercetina e o canferol. Os ácidos fenólicos como o ácido gálico e cafeico estão associados a propriedades organolépticas, nutricionais e antioxidantes de alimentos e estes resultados sugerem que os flavonóis e as catequinas, juntamente com o ácido gálico e cafeico desempenham um papel fundamental nas propriedades nutricionais destes frutos. Desta forma, a elevada correlação ($R^2=0,849$, correlação linear entre fenólicos e TAA; $R^2=0,949$, correlação linear entre flavonoides e FRAP) entre o conteúdo em compostos fenólicos e a atividade antioxidante encontrada nestas plantas pode ser explicada pela presença destes compostos majoritários.

As correlações significativas ($R^2=0,663$) entre o conteúdo em ácido ascórbico e a atividade antioxidante avaliada pelos diferentes ensaios, sugere que este composto contribui para a atividade antioxidante dos extratos de frutos estudados, sendo estes potenciais fontes de antioxidantes naturais. Além disso, o conteúdo em fenólicos totais mostrou uma forte correlação com os métodos TAA, RP, FRAP e ABTS, indicando que estes compostos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante existente nos extratos estudados. Amensour *et al.* (2010) mostra que um elevado conteúdo em polifenóis totais aumenta a atividade antioxidante e que existe uma correlação linear entre o conteúdo em fenólicos e a atividade antioxidante. Por outro lado, o método DPPH apresentou correlações pouco significativas ($p < 0,05$) com o conteúdo em fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas e taninos, indicando que os antioxidantes presentes nos extratos não possuem capacidade para reduzir o radical livre DPPH como possuem para reduzir o radical ABTS^{•+} e/ou o ferro (III).

No que diz respeito aos extratos de folhas de *Rubus* estudados, a RUN2 apresentou, em geral, o maior conteúdo em compostos bioativos e a maior atividade antioxidante. Esta espécie é referida por vários autores (Egea *et al.*, 2010; Dall'Acqua *et al.*, 2008; Martini *et al.*, 2009) pela sua elevada atividade antioxidante e conteúdo em compostos fenólicos. A *Rubus ulmifolius* Schott não cultivada é conhecida pelas suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, anti-dontálgicas e gastrointestinais (Sisti *et al.*, 2008).

Em relação aos diferentes solventes usados nas extrações, o extrato aquoso (infusão a 95°C) mostrou o maior poder de extração de compostos bioativos e de antioxidantes, em particular quando a extração destes antioxidantes foi avaliada pelo método ABTS, indicando, mais uma vez, que estes compostos possuem elevada capacidade para reduzir o radical ABTS^{•+}, em comparação com a capacidade que possuem para reduzir o radical livre DPPH e /ou o ferro (III). Fatores como a estereoseletividade dos radicais e a solubilidade dos solventes, nos diferentes métodos testados, têm sido reportados (Jimoh, 2010) por afetarem a capacidade dos extratos em reagir e reduzir os diferentes radicais. Wang *et al.* (1998) descobriu que alguns compostos que possuem capacidade de reduzir o radical ABTS^{•+} não possuem capacidade de reduzir o radical DPPH.

As folhas estudadas apresentaram elevados conteúdos em fenólicos totais e a correlação linear existente entre estes compostos e a sua atividade antioxidante ($R^2=0,910$, correlação linear entre o conteúdo em fenólicos totais e a atividade antioxidante avaliada pelo ensaio TAA; $R^2=0,857$, correlação linear entre o conteúdo em fenólicos totais e a atividade antioxidante avaliada pelo ensaio ABTS) sugere que os fenólicos totais são os principais responsáveis pela atividade antioxidante existente nestes extratos. Por outro lado, os coeficientes de correlação significativamente baixos existentes entre os conteúdos em flavonoides totais ($R^2= 0,305$, coeficientes de correlação entre flavonoides e a atividade antioxidante avaliada pelo ensaio ABTS) e antocianinas ($R^2=0,016$, coeficiente de correlação entre as antocianinas e a atividade antioxidante avaliada pelo ensaio ABTS) e a atividade antioxidante avaliada por vários ensaios, indicam que não são estes compostos bioativos os maiores contribuintes para a atividade antioxidante dos extratos estudados. Este facto seria de esperar, uma vez que tanto os flavonoides totais ($R^2=0,311$) como as antocianinas ($R^2=0,237$) mostraram uma correlação pouco significativa com o conteúdo em fenólicos totais. Isto sugere que, além dos flavonoides, existem outros compostos fenólicos (ácidos fenólicos, entre outros) responsáveis pela atividade antioxidante existente nestes extratos de folhas de *Rubus*. As elevadas concentrações em ácido gálico e cumárico encontradas nestes extratos, juntamente com os teores em canferol, podem justificar a

elevada correlação entre o conteúdo em fenólicos totais e a atividade antioxidante encontrada nestas folhas.

Assim, pode concluir-se que as folhas estudadas, constituem fontes ricas em compostos biologicamente ativos, os quais, possuem importantes propriedades antioxidantes, podendo contribuir significativamente para as exigências nutricionais do homem e devendo ser fontes de nutrientes complementares a outras fontes principais.

5 Conclusão final

Os diferentes extratos obtidos a partir de frutos de plantas *Rubus* obtidos no sul de Portugal, apresentaram valores de pH e conteúdo em açúcares (°Brix) que contribuem para o seu sabor característico. A sua acidez ideal para a industrialização demonstrou, ainda, aptidão para serem comercializados na forma de produtos industrializados. Estes frutos apresentaram elevado valor nutricional, podendo ser usadas como fontes de nutrientes para consumo *em fresco*, principalmente compostos bioativos com grande poder antioxidante, parecendo serem promissoras para fins nutricionais e medicinais, uma vez que estes antioxidantes previnem uma série de disfunções do nosso organismo. No entanto, dos frutos estudados, é de destacar o espécime não cultivado (RUN2) que, além de ter apresentado as melhores características físico-químicas, mostrou o maior teor em compostos fenólicos e a maior atividade antioxidante.

No que diz respeito aos extratos de folhas de *Rubus*, os espécimes não cultivados apresentaram os melhores resultados, sendo o espécime do Algarve (RUN2) o que apresentou o maior conteúdo em fitonutrientes, assim como uma maior atividade antioxidante, quando comparado com o espécime do Alentejo (RUN1). Este facto pode ser justificado pelas diferenças edafoclimáticas destas duas regiões.

Relativamente aos diferentes solventes estudados, conclui-se que o solvente aquoso (95°C) se revelou o melhor solvente de extração para avaliação das amostras de plantas de *Rubus* estudadas. A capacidade de extração de compostos bioativos e de antioxidantes naturais depende grandemente da estereoseletividade do solvente usado no sistema de extração.

De entre os antioxidantes presentes nas amostras estudadas neste trabalho, os que desempenham um papel de maior relevância são os compostos fenólicos, nomeadamente os flavonoides, antocianinas e taninos. As propriedades benéficas destes compostos podem ser atribuídas à sua capacidade para reduzirem os radicais livres. Além dos compostos fenólicos, existem outros componentes presentes nestas plantas que possuem atividade antioxidante, nomeadamente o ácido ascórbico. Além disso, os compostos bioativos presentes nos extratos de frutos e folhas (*Rubus*) analisados, correlacionam-se de uma forma bastante significativa com a atividade antioxidante desses mesmos extratos, sugerindo que estes compostos bioativos são os principais contribuintes para a atividade antioxidante. Assim, as plantas aqui estudadas podem potencialmente ser usadas como fontes facilmente acessíveis de antioxidantes naturais necessários à indústria alimentar, cosmética e farmacêutica.

6 Referências Bibliográficas

- Alice, L. A., & Campbell, C. S. (1999). Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *American Journal of Botany*, 86 (1), 81-97.
- Amensour, M., Sendra, E., Abrini, J., Pérez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2010). Antioxidant activity and total phenolic compounds of myrtle extracts. *Journal of Food*, 8 (2), 95-101.
- Angelo, P. M., & Jorge, N. (2007). Phenolic compounds in foods - A brief review. *Ver Inst Adolfo Lutz*, 66 (1), 232-240.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed.; Hortwitz, W., Ed.; The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence: Caithersburg, Maryland, 2005.
- Barros, J. Â. C., Campos, R. M. M., & Moreira, A. V. B. (2010). Antioxidant activity in wines made from jabuticaba and grape. *Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition*, 35 (1), 73- 83.
- Balogh, E., Hegedús, A., & Stefanovits-Bányai, É. (2010). Application of and correlation among antioxidant and antiradical assays for characterizing antioxidant capacity of berries. *Scientia Horticulturae*, 125, 332-336.
- Bate-Smith, E. C., & Swain, T. (1962). *Comparative Biochemistry*. New York, Academic Press.
- Benvenuti, S., Pellati, F., Melegari, M., & Bertelli, D. (2004). Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *Journal of Food Science*, 69 (3), FCT164-9.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.*, 299, 15-27.
- Berker, K. I., Güçlü, K., Tor, I., Demirata, B., & Apak, R. (2009). Total antioxidant capacity assay using optimized ferricyanide/prussian blue method. *Food Analytical Methods*.
- Buricová, L., & Réblová, Z. (2008). Czech medicinal plants as possible sources of antioxidants. *Czech Journal Food Science*, 26 (2), 132-138.
- Buricová, L., Andjelkovic, M., Cermáková, A., Réblová, Z., Jurcek, O., Kolehmainen, E., Verhé, R., & Kvasnicka, F. (2011). Antioxidant capacity and antioxidants of strawberry, Blackberry, and raspberry leaves. *Czech Journal Food Science*, 29 (2), 181-189.

- Capecka, E., Mareczek, A., & Leja, M. (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. *Food Chemistry*, 93, 223- 226.
- Carvalho, E. B. (2007). Estudos da interação entre proteínas e taninos: Influência da presença de polissacarídeos. Tese de Doutorado em Química. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Porto.
- Carvalho, I. S., Cavaco, T., Carvalho, L. M., & Duque, P. (2010). Effect of photoperiod on flavonoid pathway activity in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) leaves. *Food Chemistry*, 118, 384-390.
- Carvalho, I. S., Cavaco, T. & Brodelius, M. (2011). Phenolic composition and antioxidant capacity of six artemisia species. *Industrial Crops and Products*, 33, 382-388.
- Castroviejo, S. et al. (Eds.) (1998). *Flora Ibérica – Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*, vol VI, ROSACEAE. Real Jardín Botánico, C.S.I.C. Madrid.
- Cavaco, T. M. G. (2007). Caracterização química e bioquímica dos frutos de *Arbutus unedo* L. e de *Rubus fruticosus* Agg. Contribuição para a sua valorização. Tese de Mestrado em Agricultura Sustentável. Universidade do Algarve – Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais. Faro.
- Cheyrier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 223S-9S.
- Chim, J. F. (2008). Caracterização de compostos bioativos em amora-preta (*Rubus* sp.) e sua estabilidade no processo de armazenamento de geleias convencional e light. Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia. Universidade Federal de Pelotas.
- Clifford, M. N. & Scalbert, A. (2000). Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (7), 1118-1125.
- Constantino, L., Albasini, A., Rastelli, G., & Benvenuti, S. (1992). Activity of polyphenolic crude extracts as scavengers of superoxide radicals and inhibitors of xanthine oxidase. *Planta Med*, 58, 342-4.
- Crohns, M. (2010). Antioxidants, Cytokines and Markers of Oxidative Stress in Lung Cancer. Faculty of Medicine of the University of Tampere.
- Çetin, Ç., & Özgen, M. (2010). Comparison of antioxidant capacity and phytochemical properties of wild and cultivated red raspberries (*Rubus idaeus*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 540-544.

- Dai, J., Gupte, A., Gates, L., & Mumper, R. J., (2009). A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 837-847.
- Dall'Acqua, S., Cervellati, R., Loi, M. C., & Innocenti, G. (2008). Evaluation of in vitro antioxidant properties of some traditional Sardinian medicinal plants: Investigation of the high antioxidant capacity of *Rubus ulmifolius*. *Food Chemistry*, 106, 745-749.
- Degáspari, C. H., & Waszczyński, N. (2004). Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*, 5 (1), 33-40.
- Egea, I., Sánchez-Bel, P., Romojaro, F., & Pretel, M. T. (2010). Six edible wild fruits as potential antioxidant additives or nutritional supplements. *Plant Foods Human for Human Nutrition Journal*, 65, 121-129.
- Eyduran, S. P., & Agaoglu, Y. S. (2011). Determination of bud structure and floral development periods of some raspberry cultivars in Ankara (Ayas) conditions. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 21 (1), 48-56.
- Ferraz, A., Aguiar, A., Contreras, D., & Rodríguez, J. (2007). Mecanismo e aplicações da reação de Fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. *Química Nova*, 30 (3), 623-628.
- Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). The problem of using onedimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1941.
- Garzón, G. A., Riedl, K. M., & Schwartz, S. J. (2009). Determination of anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant activity in Andes berry (*Rubus glaucus* Benth). *Journal of Food Science*, 74 (3), 227-232.
- Giusti, M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*: F1.2.1-F1.2.13
- Gómez-Plaza, E., Miñano, A., & López-Roca, J. M. (2006). Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. *Food Chemistry*, 97 (1), 87-94.
- Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. *Connaissance Vigne Vin*, 18, 253-271.
- Gudej, J., & Tomczyk, M. (2004). Determination of flavonoids, tannins and ellagic acid in leaves from *Rubus* L. species. *Archives of Pharmacal Research*, 27 (11), 1114-1119.
- Hagerman, A. E. (2002). Condensed tannin structural chemistry. *The Tannin Handbook*.

- Hagerman, A. E. (2010). Hydrolyzable tannin structural chemistry. *The Tannin Handbook*.
- Hassimotto, N. M. A., Mota, R. V., Cordenunsi, B. R., & Lajolo, F. M. (2008). Physico-chemical characterization and bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubus* sp.) grown in Brazil. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 28 (3), 702-708.
- Hermann, K. M., & Weaver, L. M. (1999). The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 473-503.
- Hirsch, G. E. (2011). Valor nutricional e capacidade antioxidante de diferentes genótipos de amora-preta (*Rubus* sp.). Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria.
- Huang, Y. C., Chang, Y. H., & Shao, Y. Y. (2006). Effects of genotype and treatment on the antioxidant activity of sweet potato in Taiwan. *Food Chemistry*, 98, 259-538.
- Ibrahim, T. A., El-Hefnawy, H. M., & El-Hela, A. A. (2010). Antioxidant potential and phenolic acid content of certain cucurbitaceous plants cultivated in Egypt. *Natural Product Research*, 24 (16), 1537-1545.
- Jaakola, L., Määttä, K., Pirttilä, A. M., Törrönen, R., Kärenlampi, S., & Hohtola, A. (2002). Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiol*, 130 (2), 729-739.
- Jaakola, L., Määttä, K., Kärenlampi, S., & Hohtola, A. (2004). Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Plant Physiology*, 218 (5), 721-728.
- Jacques, A.C., & Zambiasi, R.C. (2011). Phytochemicals in Blackberry. *Ciências Agrárias, Londrina*, 32 (1), 245- 260.
- Jimoh, F. O., Adedapo, A. A., & Afolayan, A. J. (2010). Comparison of the nutritional value and biological activities of the acetone, methanol and water extracts of the leaves of *Solanum nigrum* and *Leonotis leonorus*. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 964-971.
- Jung, C. H., Seog, H. M., Choi, I. W., Park, M. W., & Cho, H. Y. (2006). Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. *LWT*, 39, 266-274.
- Kawamata, S. (1997). Studies on sugar component for fruits by gas-liquid chromatography. *Bulletin Tokio Agricultural Experiment Station*, 10, 53-63.
- Kelebek, H., Canbas, A., & Selli, S. (2008). Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs. Moro Sanguinello (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grown in Turkey. *Food Chemistry*, 107, 1710–1716.

- Lamaison, J. L., & Carnat, A., (1990). Teneurs en acide rosmarinique, en dérivés hydroxycinnamiques totaux et activité antioxydantes chez les Apiacées, les Borraginacées et les Lamiacées médicinales. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 65, 315–320.
- Li, H. B., Wong, C.C., Cheng, K.W., & Chen, F. (2008). Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT*, 41, 385–390.
- LIU, R. H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 517S–520S.
- Longhi, J. G. (2007). Atividade biológica da semente de *Mucuna pruriens*. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., Tunón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades e acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, XVII (6), 271-278.
- Martini, S., D'Addario, C., Colacevich, A., Focardi, S., Borghini, F., Santucci, A., Figura, N., & Rossi, C. (2009). Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34, 50-59.
- McRae, J. M., & Kennedy, J. A. (2011). Wine and grape tannin interactions with salivary proteins and their impact on astringency: A review of current research, 16, 2348–2364.
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523–1542.
- Nakajima, J., Tanaka, I., Seo, S., Yamazaki, M. & Saito, K. (2004). LC/PDA/ESI-MS Profiling and Radical Scavenging Activity of Anthocyanins in various Berries. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004:5, 241-247.
- Nakamura, Y., Tsuji, S., & Tonogai, Y. (2003). Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils. *Journal of Health Science*, 49, 45–54.
- Norma Portuguesa 785 (1985).
- Norma Portuguesa 3030 (1985).

- Oliveira, I., Coelho, V., Baltasar, R., Pereira, J. A., & Baptista, P. (2009). Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1507-1511.
- Olszewska, M. A., & Michel, P. (2009). Antioxidant activity of inflorescences, leaves and fruits of three *Sorbus* species in relation to their polyphenolic composition. *Natural Product Research*, 23 (16), 1507-1521.
- Oyaizu, M. (1986). Studies of products browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315
- Panizzi, L., Caponi, C., Catalano, S., Cioni, P.L., & Morelli, I. (2002). In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 165-168.
- Pantelidis, G. E., Vasilakakis, M., Manganaris, G. A., & Diamantidis, G. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*, 102, 777-783.
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337-341.
- Prior, R. L. (2003). Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78 (3), 570-578.
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenolics as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, 48 (8), 3396-3402.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine Journal.*, 26, 1231-1237.
- Record, I. R., Dreosti, I. E., & McInerney, J. K. (2001). Changes in plasma antioxidant status following consumption of diets high or low in fruits and vegetables or following dietary supplementation with an antioxidant mixture. *British Journal of Nutrition*, 85, 4459-4464.

- Reynerston, K. A., Yang, H., Jiang, B., Basile, M. J., & Kennelly, E. J. (2008). Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry*, 109, 883-890.
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. D. (2007). Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{•+}. *Comunicado Técnico*, 128.
- Santana, M. T. A., Siqueira, H. H., Lacerda, R. J., & Lima, L. C. O. (2008). Physical chemistry and enzymatic characterization of grape *Patricia* cultivated in Primavera do Leste – MT. *Ciência e Agrotecnologia*, 32 (1), 186-190.
- Schmauch, G., Chamault, C., Teissedre, P.-L., & Saucier, C. (2010). Kinetics and stoichiometry of grape seed tannins/BSA interactions. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 67-74.
- Seeram, N.P., Adams, L.S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H.S., & Heber, D. (2006). Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9329-9339.
- Sisti, M., Santi, M., Fraternali, D., Ninfali, P., Scoccianti, V., & Brandi, G. (2008). Antifungal activity of *Rubus ulmifolius* Schott standardized in vitro culture. *LWT*, 41, 946-950.
- Sobhy, M., Mohsen, A., & Ammar, S. M. (2009). Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Foods Chemistry*, 112 (3), 595-98.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Dommes, J. (2010). Evaluation of spectrophotometric methods for antioxidant compound measurement in relation to total antioxidant capacity in beverage. *Food Chemistry*, 120 (2), 607–614
- Trabelsi, N., Megdiche, W., Ksouri, R., Falleh, H., Oueslati, S., Soumaya, B., Hajlaoui, H., & Abdelly, C. (2010). Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT – Food Science and Technology*, 43, 632-639.
- Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 701-705.
- Wang, M., Li, J., Rangarajan, M., Shao, Y., La Voie, E. J., Huang, T., & Ho, C. (1998). Antioxidative phenolic compounds from Sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4869-4873.

- Wang, S. Y., & Lin, H. S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of Blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (2), 140-146.
- Wang, S.Y., & Zheng, W., (2001). Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4977-4982.
- Yen, G-C., Duh, P-D., & Chuang, D-Y. (2000). Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone. *Food Chemistry*, 70, 437-441.
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2003). Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2), 502-509.

Abstract submetido e aceite

5th International Conference on Polyphenols and Health

(Barcelona, 17-20 Outubro 2011)

Antioxidant activity and total phenolic content of fruits extracts (*Rubus spp.*)

Ana Sobral¹ and Isabel S. Carvalho^{1,*}

¹IBB/CGB-Institute for Biotechnology and Bioengineering/ Centre of Genomics and Biotechnology, Faculty of Sciences and Technology - University of Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal

Abstract

Introduction: *Rubus* represents a diverse genus of plants that mainly inhabit the northern hemisphere. Particular attention has been devoted to *Rubus* genus because of their high antioxidant activity and phenolic content. Like other fruits, berries may have additional health benefits, as they are rich sources of micronutrients and phytochemicals such as phenolics and ascorbic acid. Blackberries (*Rubus sp.*) and red raspberries (*Rubus idaeus* L.), in particular, are known to demonstrate strong antioxidant capacity, mainly as a result of their high levels of phenolics compounds.

This study aimed to analyze the total phenolic content and antioxidant activity of aqueous extracts (water at room temperature and infused at 95 °C), ethanol and methanol extracts of fresh fruits (*Rubus spp.*) selected in southern Portugal, as potential sources of natural antioxidants.

Methodology: Total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method (Huang *et al.*, 2006) and antioxidant activity was evaluated according to the procedure of Prieto *et al.* (1999) both with slight modification.

Results and discussion: The results pointed to higher antioxidant activity and higher total phenolic content in the blackberry, in the four different extracts. Both in blackberry and raspberry, the methanol extract showed the highest antioxidant activity (measured in Ascorbic Acid Equivalent, AAE) (6.90 mg AAE/ g sample and 6.30 mg AAE/ g sample in the blackberry and the raspberry, respectively) and higher total phenolic content (measured in Gallic Acid Equivalent, GAE) (1.88 mg GAE / g sample and 1.32 mg GAE / g sample in the blackberry and raspberry, respectively). The phenolic content has a strong correlation with antioxidant activity ($R^2 = 0.823$).

Conclusions: The results suggest that phenolic compounds are the major contributors to the antioxidant activities of *Rubus spp.*, which could be used as an easily accessible source of natural antioxidants and as a possible food supplement.

Apêndice I – Preparação da solução metanólica de cloreto de alumínio

- Solução metanólica de cloreto de alumínio hexahidratado 2%: 2 g de $\text{AlCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ foram dissolvidas em metanol para um volume final de 100 mL.

Apêndice II – Preparação das soluções necessárias para a realização do método espectrofotométrico das antocianinas monoméricas totais

- Tampão cloreto de potássio 0,025 M, pH 1,0: Num copo, misturou-se 1,86 g de KCl e 980 mL de água destilada; mediu-se e ajustou-se o pH da solução para 1,0 com HCl concentrado; transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 1L e fez-se o volume com água destilada.
- Tampão acetato de sódio 0,4 M, pH 4,5: Num copo, misturou-se 54,43 g de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}_3^+ \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 960 mL de água destilada; mediu-se e ajustou-se o pH da solução para 4,5 com HCl concentrado; transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 1L e fez-se o volume com água destilada. As soluções devem ser estáveis à temperatura ambiente por alguns meses, no entanto o pH deve ser verificado e ajustado sempre que se proceder às análises.

PM é o peso molecular

DF é o fator de diluição (Nota 2)

ϵ é a absorvidade molar (Nota 3)

Quando a composição da amostra é desconhecida, o pigmento é expresso como cianidina-3- glucósido, onde $\text{PM} = 449.2$ e $\epsilon = 26\ 900$.

Nota 1: O espectro da amostra (260-710 nm) foi obtido para determinar o comprimento de onda com máxima absorvência ($\lambda_{\text{vis-max}}$).

Nota 2: Se 0,2 mL de amostra é diluído em 3mL, $\text{FD} = 15$

Nota 3: Usar o valor de ϵ reportado na literatura (Giusti, M., & Wrolstad, R. E., 2001) em solventes aquosos acidificados.

Apêndice III – Preparação das soluções necessárias para a realização do método espectrofotométrico dos taninos condensados

- Solução de vanilina 1%: 1 g de vanilina foi dissolvida em metanol para perfazer um volume final de 100 mL.
- Solução de HCl 9M: 7,2 mL de HCl concentrado foi dissolvido em metanol para um volume final de 100 mL.

Apêndice IV – Preparação da solução TAA

Foram preparadas as seguintes soluções: ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 Mm. Com estas três soluções foi preparada a solução de TAA: O ácido sulfúrico concentrado (3,36 mL) foi adicionado a 50 mL de água destilada, onde se dissolveu posteriormente 0,494 g de molibdato de amônio $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ e finalmente 1,064 g de fosfato de sódio, perfazendo-se com água destilada para um volume final de 100 mL.

Apêndice V- Composição das soluções preparadas para a realização do método RP

- **Tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6):** 68,5 mL de uma solução de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2M foram misturados com 31,5 mL de uma solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M.
 - Solução de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M: 7,80 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foram dissolvidas em água destilada para um volume final de 250 mL.
 - Solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M: 8,89 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foram dissolvidas em água destilada para um volume final de 250 mL.
- **Solução de ferrocianato de potássio (1%, w/v):** dissolveu-se 1,0 g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em 1,0 mL de HCl 1M e diluiu-se em água destilada para se obter um volume final de 100 mL.
- **Solução de cloreto de ferro (0,1%, w/v):** foram dissolvidas 0,1 g de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 1,0 mL de HCl 1M e diluiu-se a solução em água destilada a fim de se obter um volume final de 100 mL.
- **Solução de ácido tricloroacético (10%, w/v):** dissolveram-se 10,0 g TCA em água destilada e fez-se o volume para 100 mL.
- **Solução de HCl 1M:** pipetaram-se 8,4 mL de HCl para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água destilada.

Apêndice VI – Composição das soluções preparadas para a realização do teste FRAP

- **Tampão acetato 300 mM:** Num balão volumétrico de 1L, adicionou-se 3,1 g de acetato de sódio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) a 16 mL de ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), fez-se o volume com água destilada e guardou-se a 4 °C.

- **TPTZ 10 mM em HCl 40 mM:** Num balão volumétrico de 25 mL, foram diluídos 0,078 g de TPTZ em 84µL de ácido clorídrico e o volume foi completado com água destilada.
- **Cloreto de ferro 20 Mm:** 0,054 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foram diluídos em água destilada, num balão volumétrico de 10 mL.

A solução de trabalho (solução FRAP) foi preparada com 2,5 mL de solução de cloreto de ferro, 2,5 mL de solução TPTZ e 25 mL de tampão acetato. Esta solução foi aquecida a 37 °C antes de ser utilizada.

Apêndice VII – Preparação da solução de DPPH

- Solução metanólica de DPPH 0,16 mM: Num balão volumétrico de 100 mL, foram dissolvidas 0,0099 g de DPPH em metanol.

Apêndice VIII – Preparação da solução ABTS

Preparou-se uma solução catiónica de ABTS, misturando 25 mL de uma solução ABTS (7 mM) com 440 µL de uma solução de persulfato de potássio (140 mM). Esta reagiu por 12 horas, à temperatura ambiente e ausência de luz. Após formado o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, adicionou-se etanol à solução até se obter um valor de absorvência de $0,7 \pm 0,02$ a 734 nm.