

MARIA JOÃO DE BRITO CAMPOS

**PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E
APLICAÇÕES DO FRUTO
OPUNTIA FICUS-INDICA (L.)
MILL.**



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

2016

MARIA JOÃO DE BRITO CAMPOS

**PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E
APLICAÇÕES DO FRUTO
OPUNTIA FICUS-INDICA (L.)
MILL.**

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

- Prof.(a) Dr(a). Maria Graça Costa Miguel
- Prof.(a) Dr(a). Cristina Dias



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

2016

Declaração de autoria de Trabalho

**PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E
APLICAÇÕES DO FRUTO
OPUNTIA FICUS-INDICA (L.)
MILL.**

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright©
Maria João de Brito Campos

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivo.

Agradecimentos

A presente dissertação apenas foi possível graças à colaboração de várias pessoas, às quais gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Prof.(a) Maria Graça Miguel, pelo seu apoio incondicional e incansável durante todo o processo, assim como pela sua disponibilidade, orientação, incentivo e paciência. Gostaria também de agradecer à Prof.(a) Cristina Dias, por me ter recebido no laboratório Hércules de forma tão prazerosa, pelo apoio e disponibilidade.

À Doutora Ana Manhita, e Sérgio Martins do laboratório Hércules, pelos momentos bem passados e por toda a ajuda, disponibilidade e orientação.

À Doutora Adriana Guerreiro e Doutora Custódia Gago pelo apoio, encorajamento e ajuda nos momentos mais complicados.

Ao Eng. José Alves, a quem devo praticamente tudo, pois foi dele que surgiu a ideia de trabalhar com este fruto, e quem forneceu o material necessário. Obrigado pela ideia, encorajamento e apoio.

Em especial, à minha colega de curso Alexandra Santos, com quem iniciei este projeto, e com quem partilhei grande parte do trabalho de investigação, um muito obrigado por ter partilhado este projeto comigo e pela ajuda e apoio, pois sem dúvida que sem ela não teria sido o mesmo.

Por último, e não menos importante, a toda a minha família, mãe, pai, irmã e namorado pela vossa compreensão, apoio e principalmente paciência nos dias menos bons. Obrigado por estarem sempre do meu lado e por me fazerem acreditar que tudo é possível!

Mais uma vez, um muito obrigado a todos os que de alguma forma fizeram parte deste trabalho, por terem participado e ajudado nesta grande etapa da minha vida.

Obrigada! 😊

Resumo

O objetivo do presente estudo foi caracterizar em termos físicos [comprimento, diâmetro, peso, firmeza, cor, teor de sólidos solúveis (TSS), pH inicial e acidez titulável] e químicos (identificação e quantificação de fenóis e betalaínas] a casca e a polpa do fruto de dois ecótipos de *Opuntia ficus-indica*, bem como avaliar a capacidade antioxidante e de inibição da enzima acetilcolinesterase. Para a maior parte dos parâmetros avaliados, o ecótipo roxo apresentou valores superiores comparativamente ao ecótipo laranja.

Após extração de alguns compostos bioativos da polpa e da casca dos frutos de ambos os ecótipos, quantificaram-se os fenóis totais e as betalaínas. O valor mais elevado de fenóis totais foi observado nos extratos das cascas de ambos os ecótipos. O teor mais elevado das betacianinas foi observado no extrato aquoso da casca do ecótipo roxo, ao passo as betaxantinas estavam em maior concentração no extrato aquoso da casca do ecótipo laranja.

Após uma extração prévia por SSDM (sea sand disruption method), os compostos foram separados e identificados por LC-ESI-MS/MS (Liquid Chromatography-Electrospray Ionization - Tandem Mass Spectrometry). Os compostos, maioritariamente nas cascas dos dois ecótipos, incluíram o ácido eucómico, ácido ferúlico, feruloil-glucose, e os derivados de flavonóides (quercetina-*O*-glicosídeos e isoramnetina-*O*-glicosídeos). Para as betalaínas foi possível identificar betanina, isobetanina e indicaxantina, maioritariamente no ecótipo roxo.

Foi também quantificada a capacidade antioxidante através dos métodos de captação de radicais ABTS [2,2'-azino-*bis*(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acide] e da capacidade de redução do Mo(VI) a Mo(V). Para ambos os métodos, observou-se uma maior atividade para o extrato aquoso da casca do ecótipo roxo.

Os extratos aquosos do ecótipo laranja apresentaram a melhor capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase.

Os resultados permitem concluir que a casca do fruto *Opuntia ficus-indica* é a parte do fruto mais promissora em termos de compostos bioativos.

Palavras Chave: *Opuntia*, Fenóis, Betalaínas, LC/MS, Ecótipo, Atividade

Abstract

The aim of this study was to characterize physically [length, diameter, weight, firmness, color, soluble solids (TSS), initial pH and titratable acidity] and chemically (identification and quantification of phenols and betalains] the peel and pulp of two ecotypes of *Opuntia ficus-indica* fruit, and evaluate the antioxidant capacity and inhibition of acetylcholinesterase. For most of the parameters evaluated, purple ecotype showed higher values compared to orange ecotype.

After extraction of some bioactive compounds of the pulp and peel of both ecotypes, were quantified total phenols and betalains. The highest value of total phenols was observed in extracts from the peel of both ecotypes. The highest content of betacyanins was observed in aqueous extract of the purple peel ecotype, while the betaxantinas were in higher concentration in the aqueous extract of the orange peel ecotype.

After a pre-extraction SSDM (sea sand disruption method), the compounds were isolated and identified by LC-ESI-MS/MS (Liquid Chromatography-Electrospray Ionization - Tandem Mass Spectrometry). The compounds, mostly in the peels of the two ecotypes, included eucomic acid, ferulic acid, feruloyl glucose, and derivatives of flavonoid (quercetin-*O*-glycosides and isorhamnetin-*O*-glycosides). For betalains were identified betanin, isobetanin and indicaxantin, mostly in purple ecotype.

It was also quantified antioxidant capacity by the capturing radicals method ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acide)] and reduction capacity of Mo(VI) to Mo (V). For both methods, there was more activity in aqueous extract of the of the purple peel ecotype.

The aqueous extract of orange ecotype showed the best ability to inhibit the enzyme acetylcholinesterase.

The results showed that the peel *Opuntia ficus-indica* fruit is the part with the most promising result in terms of bioactive compounds.

Key Words: *Opuntia*, Phenols, Betalains, LC/MS, Ecotype, Activity

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo	ii
<i>Abstract</i>	iii
Índice geral	iv
Índice de Figuras	vii
Índice de Quadros	viii
Abreviaturas	ix
1. Introdução	1
2. Caracterização do fruto <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill	3
2.1 Descrição morfológica do fruto <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill	3
2.2 Composição química do fruto <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill	5
2.3 Potencial biológico do fruto <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill	10
2.3.1 Efeito anticancerígeno	11
2.3.2 Efeito antioxidante	11
2.3.3 Efeito anti-inflamatório	13
2.3.4 Efeito hipoglicemiante	14
2.3.5 Efeito nas lipoproteínas plasmáticas	14
2.3.6 Outros efeitos	14
3. Materiais e métodos	15
3.1 Amostra	15
3.2 Reagentes	15
3.3 Propriedades físico-químicas e observação morfológica do fruto <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill	16
3.3.1 Observação morfológica	16
3.3.2 Determinação de teor de sólidos solúveis (°Brix)	17
3.3.3 Quantificação da acidez titulável	17
3.4 Preparação e extração do fruto <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill	17

3.5	Quantificação de compostos bioativos presentes no fruto <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill	18
3.5.1	Fenóis totais	18
3.5.2	Betalaínas	19
3.6	Identificação de compostos bioativos presentes no fruto <i>Opuntia Ficus-indica</i> (L.) Mill, por HPLC-MS	19
3.6.1	Extração SSDM (sea sand disruption method)	19
3.6.2	Análise “high performance liquid chromatography coupled to photodiode array detector” (HPLC-DAD)	20
3.6.3	Análise “liquid chromatography-electrospray ionization - tandem mass spectrometry” (LC-ESI-MS/MS)	20
3.7	Determinação da atividade antioxidante do fruto <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill	21
3.7.1	Método de captação de radicais ABTS [2,2’-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acide)]	21
3.7.2	Método de redução de Mo(VI) a Mo(V)	21
3.8	Capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase pelo fruto <i>Opuntia Ficus-indica</i> (L.) Mill	22
3.9	Análise estatística	23
4.	Resultados e discussão de resultados	23
4.1	Propriedades físico químicas e observação morfológica do fruto <i>Opuntia Ficus-indica</i> (L.) Mill	23
4.2	Quantificação de compostos bioativos presentes no fruto <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill	28
4.2.1	Fenóis totais	28
4.2.2	Betalaínas	30
4.3	Identificação de compostos bioativos presentes no fruto <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill, por HPLC-MS	33
4.3.1	Extração por SSDM (sea sand disruption method)	33
4.3.2	Análise por HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS	35
4.3.2.1	Ácidos fenólicos	36
4.3.2.1	Quercetina- <i>O</i> -glicosídeos	38
4.3.2.3	Isoramnetina- <i>O</i> -glicosídeos	38
4.3.2.4	Betalaínas	42

4.4 Determinação da atividade antioxidante do fruto <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill	48
4.4.1 Método de captação de radicais ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acide)]	48
4.4.2 Método de redução de Mo(VI) a Mo(V)	50
4.5 Capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase pelo fruto <i>Opuntia Ficus-indica</i> (L.) Mill	51
5. Conclusão	54
6. Referências Bibliográficas	55

Índice de Figuras

Figura 2.1 – Representação do ecótipo laranja do fruto <i>Opuntia-ficus-indica</i>	4
Figura 2.2 – Representação da planta e do fruto <i>Opunia-ficus-indica</i>	4
Figura 2.3 – Representação da polpa e casca de vários ecótipos do fruto <i>Opuntia-ficus-indica</i>	4
Figura 2.4 – Estruturas químicas das principais classes de flavonóides e compostos relacionados	8
Figura 2.5 – Estrutura básica da flavona e alguns exemplos de flavonóis	9
Figura 2.6 – Ácido betalâmico e betalaínas predominantes no fruto <i>Opuntia ficus-indica</i>	10
Figura 4.7 – Cromatograma LC-DAD da casca do ecótipo laranja, em modo negativo, e extraída com a mistura trifásica de clorofórmio:metanol:água (65:10:1, v/v)	37
Figura 4.8 – Cromatograma LC-DAD da polpa do ecótipo roxo, em modo positivo, e extraída com a mistura trifásica de clorofórmio:metanol:água (65:10:1, v/v)	38
Figura 4.9 – Cromatograma LC-DAD da casca do ecótipo laranja, em modo positivo, e extraída com a mistura trifásica de clorofórmio:metanol:água (65:10:1, v/v)	41
Figura 4.10 – Cromatograma LC-DAD da casca do ecótipo roxo, em modo positivo, e extraída com a mistura trifásica de clorofórmio:metanol:água (65:10:1, v/v)	41
Figura 4.11 – Cromatograma LC-DAD da casca do ecótipo laranja, em modo positivo, e extraída com a mistura metanol:água (8:2, v/v)	43
Figura 4.12 – Cromatograma LC-DAD da casca do ecótipo roxo, em modo positivo, e extraída com a mistura metanol:água (8:2, v/v)	44
Figura 4.13 – Cromatograma LC-DAD da polpa do ecótipo roxo, em modo positivo, e extraída com a mistura metanol:água (8:2, v/v)	45

Índice de Quadros

Quadro 2.1 – Composição da polpa, casca e sementes do fruto <i>Opuntia ficus-indica</i> (%m/m, matéria seca)	6
Quadro 2.2 – Composição de hidratos de carbono da polpa, casca e sementes do fruto <i>Opuntia ficus-indica</i> (% matéria seca)	6
Quadro 2.3 – Composição mineral da polpa, casca e sementes do fruto <i>Opuntia ficus-indica</i> (mg/100g, matéria seca)	6
Quadro 2.4 – Aminoácidos livres presentes nos cladódios (<i>L</i> -aminoácidos) e polpa de fruta da espécie <i>Opuntia ficus-indica</i>	7
Quadro 2.5 – Vitaminas e Antioxidantes presentes nos cladódios e polpa do fruto, da planta <i>Opuntia</i> spp	8
Quadro 4.6 - Alguns parâmetros dos ecótipos roxo e laranja do fruto <i>Opuntia ficus-indica</i>	24
Quadro 4.7 - Parâmetros da cor dos ecótipos roxos e laranja do fruto <i>Opuntia ficus-indica</i>	25
Quadro 4.8 - Alguns parâmetros dos ecótipos roxos e laranja do fruto <i>Opuntia ficus-indica</i>	27
Quadro 4.9 - Quantificação dos fenóis totais e de betalaínas dos ecótipos roxo e laranja do fruto <i>Opuntia ficus-indica</i>	29
Quadro 10 – Identificação de compostos nos extratos do ecótipo laranja <i>Opuntia</i> spp, por HPLC-MS	46
Quadro 11 – Identificação de compostos nos extratos do ecótipo roxo <i>Opuntia</i> spp, por HPLC-MS	47
Quadro 12 – Determinação da atividade antioxidante dos ecótipos roxo e laranja do fruto <i>Opuntia ficus-indica</i>	49
Quadro 13 – Determinação da % de inibição da enzima acetilcolinesterase dos ecótipos roxo e laranja do fruto <i>Opuntia ficus-indica</i>	53

Abreviaturas

AP-1 – Proteína ativadora-1

COX₂ – Ciclo-oxigenase-2

ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular-1

IL-1 α – Interleucina-1-Alfa

iNOS – Monóxido de azoto síntase indutível

NF κ -B – Factor nuclear Kappa-B

TNF- β – Fator de necrose tumoral-Beta

1.Introdução

“O Homem sempre utilizou os produtos naturais, em particular as plantas, como meio de tratamento das suas doenças, e, ainda hoje, o emprego de medicamentos à base de plantas é muito importante em muitas regiões do mundo...”^[1]

Nos últimos tempos, tem-se assistido a um maior desenvolvimento e interesse pela fitoterapia,^[2] que constitui uma ajuda nos cuidados primários de saúde e um possível complemento terapêutico.^[1]

Hoje em dia, a fitoterapia passou a ter um maior controlo ao nível da qualidade, eficácia e segurança, porque se verificou um aumento da investigação e da existência de legislação adequada de medicamentos à base de plantas, que anteriormente não existia, uma vez que se fundamentava apenas no uso tradicional.^[2]

Na moderna indústria farmacêutica, as plantas têm contribuído para a obtenção de medicamentos através do isolamento de substâncias de natureza química bem definida e com atividade farmacológica, para além da simples obtenção de medicamentos à base de plantas. Este isolamento de compostos farmacologicamente ativos acontece através de processos extrativos apropriados^[1], e sempre que a síntese química não consiga prepará-los a um preço inferior ao do preço extrativo a partir de plantas.^[3]

Os estudos sobre a identificação de constituintes de plantas que possam levar à produção de novos medicamentos são levados a cabo por inúmeras Instituições Universitárias e Centros de Investigação, embora a descoberta de um novo composto seja cada vez mais difícil, uma vez que o número de compostos ativos existentes é muito elevado, estando o acesso limitado a grandes Laboratórios capazes de suportar o elevado investimento necessário.^[3]

“A escolha da planta a estudar deve basear-se, essencialmente, na prospeção feita sobre as informações populares e bibliográficas do seu uso, embora, após a sua identificação botânica se possa, pela posição filogenética da planta, obter dados complementares úteis para justificar essa escolha à custa de pesquisa bibliográfica.”^[3]

Estudos recentes retratam a planta *Opuntia ficus-indica*, como uma fonte de compostos bioativos, com aplicações nutricionais^[4] e farmacológicas,^[5] e revelam interesse nas suas diversas propriedades, destacando-se assim como a planta mais estudada, utilizada e difundida nas regiões semi-áridas^[6] da América do Sul e Central.^[7]

Sendo esta planta um cato, é característica de zonas quentes, sendo notável a sua capacidade em crescer e prosperar em ambientes de stress para a maioria das plantas.^[7] Possui também, uma boa capacidade de absorver e armazenar água, mesmo em situações de escassa precipitação, devido ao seu sistema de raízes pouco profundo e muito difundido.^[5]

A planta pertence à família das Cactaceas,^[8] e contém cerca de 130 géneros e 2000 espécies, sendo o género *Opuntia* um dos mais importantes devido às suas diversas aplicações. Esta tem elevada importância na economia agrícola, uma vez que é um recurso valioso, especialmente em períodos de seca.^[7] Em Portugal é subespontânea em sebes e valados, sendo cultivada para a formação de sebes artificiais.^[8]

Pode ter várias denominações tais como Cacto-dos-“figos”-da-Índia, figueira-da-barbária, nopal, nopálea, tabaios,^[8] figueira-da-índia, tuna, figuera-de-mor, e indiapico^[6]. Do ponto de vista morfológico, esta pode ser dividida em raiz, parte vegetativa, fruto e flor. A parte vegetativa corresponde aos cladódios, que consistem em caules modificados, que substituem as folhas na sua função fotossintética. Estes possuem uma forma ovóide com cerca de 18-25 cm de comprimento, e além da sua função fotossintética, também têm como função o armazenamento de água.^[5]

No entanto, o fruto tem ganho notoriedade devido aos seus benefícios nutricionais^[6] e diferentes ações farmacológicas,^[5] sendo rico em compostos bioativos antioxidantes tais como as betalaínas, os polifenóis e o ácido ascórbico. Os seus extratos têm demonstrado diferentes atividades, tais como, atividades antiulcerativas, antioxidantes, anticancerígenas, neuroprotetoras, hepatoprotetoras e antiproliferativas,^[4] justificando assim o tema da seguinte dissertação, uma vez que esta tem como objetivo, um melhor conhecimento da composição química e da atividade antioxidante do fruto da espécie *Opuntia-ficus-indica*.

2. Caracterização do fruto *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill

2.1 Descrição morfológica do fruto *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill

O fruto da espécie *Opuntia ficus-indica*, também conhecido como “cactus pear fruit”, “prickly pear”^[9] ou “figo da índia”, tem uma morfologia idêntica à de uma baga oval e alongada, com um pericarpo grosso^[5] e pequenos espinhos de celulose quase cristalina. Possui um comprimento de cerca de 4,8-10 cm, e largura de 4 a 8 cm.^[6] O peso pode variar entre 100 e 150 g, dependendo da origem, variedade, e condições edafo-climáticas.^[5] Deste peso, cerca de 30 a 40 % corresponde ao peso da casca, que nos estádios de desenvolvimento iniciais adquire uma cor esverdeada, podendo adquirir posteriormente diversas cores, tais como, branco esverdeado, amarelo, laranja, vermelho, púrpura, amarelo-arroxeadado, roxo e castanho.^[6]

A polpa é a parte comestível do fruto e é essencialmente composta por água (84-90%) e açúcares redutores (10-15%).^[5] Esta corresponde a cerca de 45% do peso total do fruto, e tendo em conta as características organolépticas, a polpa é doce, gelatinosa, muito aromática quando madura, translúcida e possui inúmeras pequenas sementes que correspondem entre 5 a 15 % do fruto.^[6]

As sementes do fruto possuem variações significativas na sua forma, tamanho, estrutura, características embrionárias e cor. Estas apresentam uma grande variação em número de fruto para fruto, desde uma a cinco sementes, a mais de 2000 por fruto. Esta variação pode ser observada entre espécies, dependendo de determinados fatores, tais como, a idade, o tamanho e o número de flores da planta.^[5]

As figuras 2.1, 2.2 e 2.3 representam o fruto da planta *Opuntia ficus-indica*, demonstrando a sua diversidade morfológica.



Figura 2.1 – Representação do ecótipo laranja do fruto *Opuntia-ficus-indica*^[10]



Figura 2.2 – Representação da planta e do fruto *Opuntia-ficus-indica*^[11]



Figura 2.3 – Representação da polpa e casca de vários ecótipos do fruto *Opuntia-ficus-indica*^[12]

2.2 Composição química do fruto *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill

O fruto *Opuntia* é conhecido por ser fonte de uma grande variedade de compostos nutricionais, cujas concentrações podem variar consoante o clima, o local de cultivo e o ecótipo.^[5]

Os Quadros 2.1, 2.2 e 2.3, representam uma compilação de alguns dos constituintes do fruto, incluindo a análise mineral. A polpa do fruto possui significativamente menos proteína, mais hidratos de carbono solúveis em etanol e menos fibras, quando comparada com a casca e as sementes. O teor de proteína do fruto liofilizado é baixa (5,3% a 11,3%), comparativamente a certas plantas leguminosas, mas semelhante aos teores encontrados em cereais, batata-doce, mandioca e inhame. O teor de fibras do fruto situa-se entre 20,5% e 54,2%, e é significativamente diferente entre a polpa, casca e sementes, o que pode fazer do fruto uma boa fonte de fibra. O componente mais abundante da polpa e casca do fruto são os hidratos de carbono solúveis em etanol. Estes constituem mais de 50% da polpa, e cerca de 30% da casca (Quadro 2.1). A polpa possui elevadas quantidades de glucose e frutose, comparativamente à casca e às sementes. A casca contém essencialmente glucose, e também pequenas quantidades de sacarose e frutose. Os açúcares sacarose, glucose e frutose (Quadro 2.2) estão ausentes nas sementes, e outros açúcares, tais como a rafinose, estaquiase e galactose, conhecidos por causar desconforto intestinal, estão ausentes nas três partes do fruto. A presença de quantidades significativas de frutose e glucose na polpa e casca, tornam o fruto uma fonte natural de açúcares, e conseqüentemente uma boa fonte de energia.^[13]

Relativamente à análise mineral, a casca contém elevadas quantidades de cálcio, potássio, magnésio e manganês, embora a polpa possua maior quantidade de ferro que a casca. As sementes são ricas em fósforo e zinco (Quadro 2.3). Estas quantidades de minerais, nas diferentes partes do fruto, podem estar relacionadas com o conteúdo destes elementos no solo. As quantidades de minerais detetadas nas diferentes partes do fruto, podem fazer deste um bom suplemento mineral para sumos, ou outros alimentos comerciais.^[13]

De acordo com a revisão feita por Alves et al.^[6], os mesmos verificaram que enquanto alguns autores referiam o fruto como uma importante fonte de cálcio e fósforo, outros destacavam-no mais como fonte de magnésio e potássio.

Quadro 2.1 – Composição da polpa, casca e sementes do fruto *Opuntia ficus-indica* (%m/m, matéria seca)^[13]

	Polpa (%m/m)	Casca (%m/m)	Sementes (%m/m)
Proteína	5,13±0,29	8,30±0,90	11,80±1,17
Azoto não proteico	0,025±0,002	0,024±0,001	0,012±0,003
Lípidos	0,97±0,06	2,43±0,32	6,77±0,51
Fibras totais	20,5±0,94	40,8±1,32	54,2±1,06
Cinzas	8,50±0,82	12,1±1,46	5,9±1,25
Hidratos de carbono solúveis em etanol	58,30±0,45	27,6±0,21	1,59±0,21
Amido	4,55±0,24	7,12±0,60	5,35±1,14

Quadro 2.2 – Composição de hidratos de carbono da polpa, casca e sementes do fruto *Opuntia ficus-indica* (% matéria seca)^[13]

	Polpa (%m/m)	Casca (%m/m)	Sementes (%m/m)
Sacarose	0,22	2,36	0
Glucose	35,0	21,0	0
Frutose	29,6	2,89	0

Quadro 2.3 – Composição mineral da polpa, casca e sementes do fruto *Opuntia ficus-indica* (mg/100g, matéria seca)^[13]

	Polpa (mg/100g)	Casca (mg/100g)	Sementes (mg/100g)
Ca	163	2090	258
Mg	76,1	322	208
Na	7,77	< 0,85	< 0,83
K	559	3430	275
P	0,063	0,064	110
Fe	16,5	8,31	12,1
Cu	< 0,78	< 0,85	< 0,83
Zn	1,55	1,70	4,16
Mn	6,99	72,9	< 0,83
Mb	< 0,31	< 0,34	< 0,33

Vários aminoácidos são encontrados no sumo do fruto, e nos cladódios, como demonstra o Quadro 2.4. Verifica-se que o fruto possui elevados níveis de aminoácidos, especialmente serina, prolina e taurina.^[5] Comparando ambos, fruto e cladódios, é possível verificar que o sumo do fruto se destaca como principal fonte de aminoácidos.

Quadro 2.4 – Aminoácidos livres presentes nos cladódios (L-aminoácidos) e polpa de fruta da espécie *Opuntia ficus-indica* ^[5]

Aminoácidos	Peso do fruto fresco	
	Cladódios (g/100g)	Sumo do fruto (mg/L)
Alanina	0,6	87,2
Arginina	2,4	30,5
Asparagina	1,5	41,6
Ácido Asparagínico	2,1	Não disponível
Ácido Glutâmico	2,6	66,1
Glutamina	17,3	346,2
Glicina	0,5	11,33
Histidina	2,0	45,2
Isoleucina	1,9	31,2
Leucina	1,3	20,6
Lisina	2,5	17,4
Metionina	1,4	55,2
Fenilalanina	1,7	23,3
Serina	3,2	174,5
Treonina	2,0	13,3
Tirosina	0,7	12,3
Triptofano	0,5	12,6
Valina	3,7	39,4
Ácido α -aminobutírico	Não disponível	1,1
Carnosina	Não disponível	5,9
Citrulina	Não disponível	16,3
Ornitina	Não disponível	Não disponível
Prolina	Não disponível	1265,2
Taurina	Não disponível	434,3

No Quadro 2.5, verifica-se que a vitamina C predomina comparativamente às restantes vitaminas detetadas quer na polpa, quer nos cladódios,^[5] e segundo certos autores, os teores de vitamina C são elevados e equiparado aos da laranja e do limão.^[6] Foram reportadas apenas quantidades vestigiais de niacina (vitamina B₃), riboflavina (vitamina B₂) e tiamina (vitamina B₁), na polpa do fruto. A vitamina lipossolúvel, vitamina E (tocoferol) e os β -carotenoides, foram também identificados.^[5]

Quadro 2.5 – Vitaminas e Antioxidantes presentes nos cladódios e polpa do fruto, da planta *Opuntia* spp.^[5]

Peso do fruto fresco (por 100 g)		
Componentes	Cladódios	Polpa do fruto
Ácido Ascórbico	7-22 mg	12-81 mg
Niacina	0,46 mg	Quantidades vestigiais
Riboflavina	0,60 mg	Quantidades vestigiais
Tiamina	0,14 mg	Quantidades vestigiais
Carotenóides totais	11,3–53,5 µg	0,29-3,37 g
• β-carotenos	Não disponível	1,2-3,0 µg
Vitamina E total	Não disponível	111-115 µg
Vitamina K	Não disponível	53 µg
Flavonóides:		
• Derivados canferol	Não disponível	0,11-0,38 g
• Derivados quercetina	Não disponível	0,98-9 g
• Derivados Iso-ramnetina	Não disponível	0,19-2,41 g

Os flavonóides (Figuras 2.4 e 2.5) são moléculas de baixo peso molecular que se encontram ampla e maioritariamente presentes em toda a parte aérea das plantas. Estes encontram-se muitas vezes hidroxilados nas posições 3,5,7,3',4', e 5', como demonstra a Figura 5. Quando estes formam heterósidos, a ligação glicosídica está normalmente localizada na posição 3 ou 7, e as oses que normalmente se formam são a L-ramnose, D-glucose ou di-holósidos de glucose e ramnose.^[14]

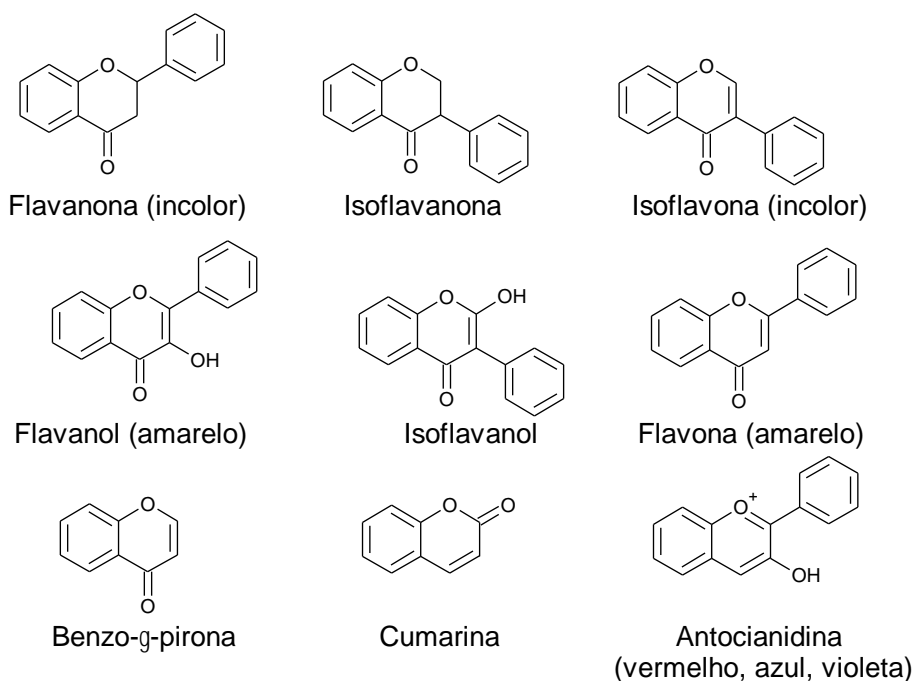


Figura 2.4 – Estruturas químicas das principais classes de flavonóides e compostos relacionados^[14]

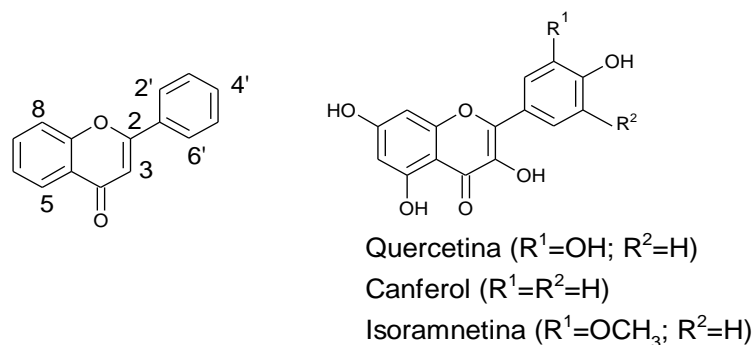


Figura 2.5 – Estrutura básica da flavona ^[14] e alguns exemplos de flavonóis ^[15]

Vários autores referem o fruto *Opuntia ficus-indica*, como uma nova fonte de óleos vegetais, embora, a quantidade de óleo extraída das sementes seja muito superior, quando comparada com a quantidade de óleo extraído da polpa e casca. Ambos os óleos são uma fonte rica de ácidos gordos essenciais e esteróis, sendo o ácido linoleico, assim como o β -sitosterol e campesterol, os maiores constituintes, respetivamente. De modo a evitar a oxidação destas frações lipídicas, estão presentes as vitaminas lipossolúveis α , β , δ , γ -tocoferol, vitamina k1 e β -caroteno, que atuam como antioxidantes naturais. Esta constituição lipídica varia, assim como os restantes componentes, com o tipo de fruto cultivado, grau de maturação, processamento da fruta e condições de armazenamento da mesma.^[5]

As betalaínas são pigmentos naturais vacuolares ^[5] e hidrossolúveis, presentes em famílias de plantas da ordem das *Cariofilales*, incluindo as *Cactaceae*. Encontram-se divididas em duas famílias, nomeadamente, as betacianinas e as betaxantinas, e ambas possuem um anel ácido betalâmico na sua estrutura base.^[16] A natureza do resíduo adicionado determina a classificação. No caso das betacianinas, são adicionados derivados do ácido hidroxicinâmico, ou açúcares, e no caso das betaxantinas, são adicionadas aminas ou aminoácidos. As betacianinas e as betaxantinas, possuem um máximo de absorção por volta dos 540 e 480 nm, respetivamente.^[16] São conhecidas por serem corantes alimentares naturais, e ao contrário de outros pigmentos naturais, a sua estrutura é relativamente estável dentro de um intervalo grande de pH, entre 4 e 7.^[17] O ácido betalâmico, assim como as principais betalaínas, existentes no fruto *Opuntia ficus-indica* encontram-se representados na figura 2.6.

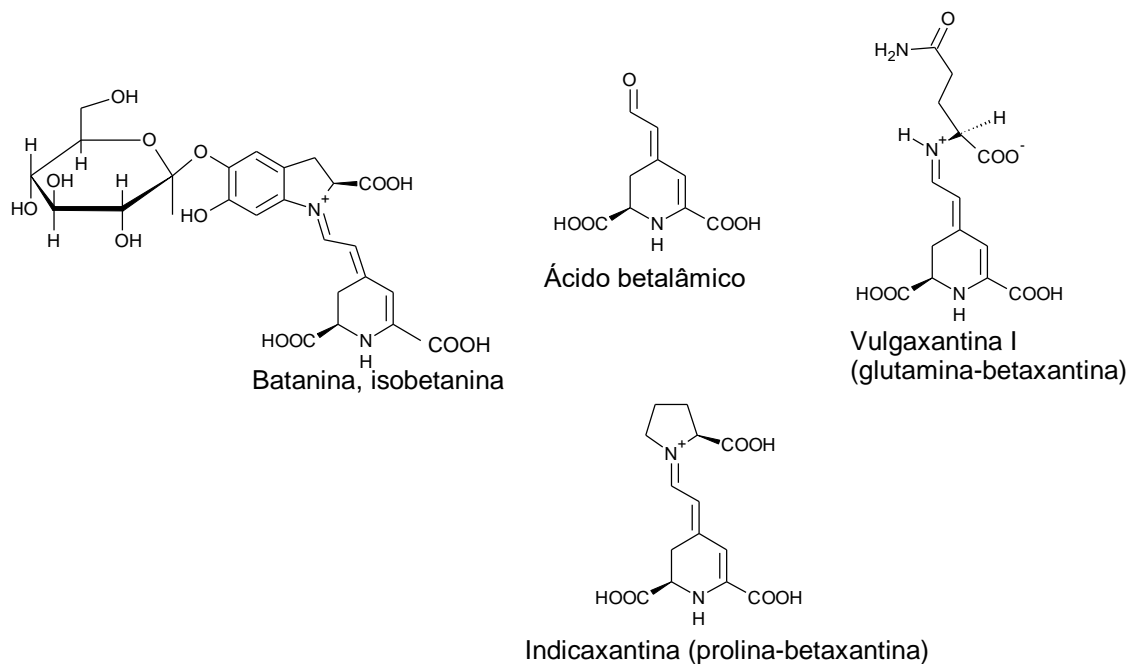


Figura 2.6 – Ácido betalâmico e betalâinas predominantes no fruto *Opuntia ficus-indica* ^[18]

2.3 Potencial biológico do fruto *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill

Nos últimos anos tem-se assistido a um aumento da procura e do estudo de compostos que possuem a capacidade de contrariar danos provocados pela toxicidade do meio ambiente e prevenir o desenvolvimento de diversas patologias. Com isto, diferentes tipos de frutos e plantas têm vindo a ser avaliados e reconhecidos como valiosas fontes nutricionais e farmacêuticas, que providenciam benefícios para a saúde que incluem a prevenção e/ ou tratamento de doenças crónicas.^[9]

O fruto *Opuntia* há muito que é conhecido na medicina tradicional por ajudar no tratamento de uma série de patologias como úlceras, dispneia, glaucoma, assim como patologias hepáticas, feridas e fadiga. Diferentes estudos utilizaram variedades europeias e asiáticas do fruto, e demonstraram uma notável atividade antioxidante que reduz significativamente o stress oxidativo em doentes e que pode ajudar a prevenir patologias crónicas.^[9] No entanto, a maioria da informação relativa a estudos farmacológicos refere maioritariamente os cladódios, comparativamente ao fruto.^[5]

2.3.1 Efeito anticancerígeno

Estudos recentes sugerem que o extrato aquoso do fruto *Opuntia* inibe a proliferação de células cancerígenas humanas cervicais, ováricas, e da bexiga, *in vitro*, e suprime o crescimento do tumor nos ovários de ratos, *in vivo*. Esta inibição está dependente da dose e do tempo em culturas de células cancerígenas *in vitro*. A administração intra-peritoneal do extrato no rato não afetou o peso corporal do animal, o que indica que o fruto não possui efeito tóxico significativo em animais. Mais importante, é o facto da inibição do tumor ser comparável com o composto *N*-(-4-hydroxyphenyl) retinamida (4-HPR), que é utilizado como agente quimiopreventivo, no cancro do ovário.^{[5] [19]}

A inibição do crescimento de culturas de células cancerígenas está associada a um aumento de células apoptóticas, a um aumento da quantidade de células na fase G1 do ciclo celular e conseqüentemente a uma diminuição da quantidade destas na fase S. Além disso, foi examinada a expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), de anexina IV e do maior supressor tumoral P₅₃. Na presença do extrato do fruto observou-se um aumento da expressão de anexina IV, uma notável diminuição da expressão VEGF e uma ligeira diminuição da expressão de P₅₃.^{[5] [19]}

O mecanismo de ação, assim como os componentes através dos quais o extrato do fruto exerce aqueles efeitos, ainda não são conclusivos, sendo por isso necessária uma investigação mais aprofundada, de modo, a identificar o potencial componente ativo e o respetivo mecanismo de ação.^[5]

Santillán et al.^[9] demonstraram que o sumo obtido por uma variedade do fruto, previne significativamente danos provocados pelo composto metanosulfonato de metilo (MMS), em ratos, através da diminuição da formação micronucleica. Este composto é um agente alquilante que possui propriedades mutagénicas, carcinogénicas e teratogénicas. O estudo refere que a proteção associada ao sumo poderá estar associada ao mecanismo antioxidativo sinérgico entre betalaínas e flavonoides.

2.3.2 Efeito antioxidante

As espécies reativas de oxigénio ou “reactive oxygen species” (ROS) e de azoto “reactive nitrogen species” (RNS) são constantemente formadas como parte do normal

funcionamento celular, associado à respiração aeróbia, processos patológicos, e à exposição tóxica a fatores ambientais da célula, durante o seu ciclo de vida. Estas espécies podem danificar uma vasta gama de biomoléculas essenciais, incluindo ácidos nucleicos (DNA/RNA), proteínas, lípidos e hidratos de carbono. O desequilíbrio entre aquelas espécies e os mecanismos de defesa antioxidantes, leva a uma modificação oxidativa em membranas celulares ou moléculas, causando patologias degenerativas, incluindo envelhecimento, cancro, arteriosclerose, e patologias cardíacas.^[20]

A presença de vários compostos antioxidantes no fruto *Opuntia*, tais como ácido ascórbico, carotenoides, glutathione reduzida, cisteína, taurina, flavonoides como a quercetina, canferol, e isorramnetina foi detetada nos frutos de diferentes variedades do cato *Opuntia*.^[5] Tais compostos podem interferir com o processo oxidativo, através da eliminação de radicais livres, formação de complexos com metais livres catalíticos, e atuando como eliminadores de oxigénio singlete, contribuindo assim, para a manutenção da saúde, através da ação contra os danos oxidativos causados pelas ROS e RNS.^[20]

Siriwardhana *et al.*^[21] demonstraram que um extrato do fruto, resultante de uma extração com metanol e ácido acético (8:2), com uma concentração de 0,1 mg/mL, poderá reduzir a espécie reativa, peróxido de hidrogénio, que induz danos ao nível do DNA de linfócitos periféricos humanos.

Já as betalaínas, também têm demonstrado efeitos benéficos na regulação de vias dependentes de reações redox envolvidas no crescimento celular e inflamação, não se tendo verificado qualquer sinal de toxicidade em humanos.^[9] Gentile *et al.*,^[22] demonstraram que as betalaínas, betaninas e indicaxantinas, podem ligar-se a proteínas de baixa-densidade (LDL), inibindo a sua oxidação.

Os polifenóis são antioxidantes com propriedades bem conhecidas, tais como, cardioprotetora, anticancerígena, antiviral e antialérgica. Estes são também potenciais modeladores da ativação dos fatores de transcrição e da proteína tirosina cinase, provavelmente devido ao aumento de ião cálcio intracelular, que induz a ativação de várias proteínas e fatores de transcrição envolvidos na transcrição de genes, levando à ativação e proliferação de linfócitos T.^[23]

2.3.3 Efeito anti-inflamatório

Segundo Allegra et al. [24], a betalaína, indicaxantina, extraída do fruto *Opuntia*, possui uma marcada atividade anti-inflamatória e um grande potencial terapêutico, por inibir a libertação de PGE2 (porstaglandina-2), NO (monóxido de azoto), IL-1b e TNF- α induzidos pela carragenina em ratos injetados com carragenina. A indicaxantina também diminuiu o volume de exsudado no local da inflamação, em ratos injetados com carragenina. Esta mucilagem é um agente inflamatório, utilizado para analisar os efeitos de fármacos anti-inflamatórios, que provoca reações inflamatórias reprodutíveis. Neste estudo, foi suprimida praticamente toda a resposta inflamatória com uma concentração de extrato de 2 μ mol/kg, daí a sua eficácia ser dose-dependente.

A atividade anti-inflamatória e os efeitos exibidos por polifenóis *in vitro*, são frequentemente diminuídos, ou até mesmo perdidos, *in vivo*, devido à sua fraca absorção e metabolização. Além disso, algumas dietas ricas em alguns constituintes tais como polifenóis, caratenóides, fitosteróis, etc, realizadas com o objetivo de modular a resposta inflamatória, apenas são efetivas quando administradas intraperitonealmente, ou administradas oralmente em doses muito elevadas, de modo a ser obtida a biodisponibilidade pretendida. A indicaxantina, contrariamente a outros compostos, possui uma elevada biodisponibilidade em humanos, e não parece ser metabolizada, durante a digestão, ou no fígado, uma vez que após absorção é recuperado no plasma sem ter sofrido alteração.[24]

Segundo Gentile et al. [22], em resposta a um estímulo inflamatório, mediado principalmente pela citocina, fator de necrose tumoral (TNF- α), são ativadas células endoteliais vasculares, que expressam moléculas de adesão celular da super família das imunoglobulinas Ig, nomeadamente a molécula de adesão intercelular (ICAM-1), presente em todos os tipos de células à exceção dos glóbulos vermelhos. A sua expressão tem como finalidade o recrutamento de leucócitos ativos, que vão permitir a defesa contra microrganismos e a sobrevivência do tecido. O mecanismo de ação do TNF- α depende, no entanto, da produção de ROS, que permitem a ativação de dois fatores de transcrição NFk-B, e AP-1. De acordo com este estudo, ambos os pigmentos betanina e betaxantina, são capazes de inibir a molécula ICAM-1, diminuindo assim a resposta inflamatória.[22]

2.3.4 Efeito hipoglicemiante

Recentemente o cato *Opuntia*, está entre os produtos mais recomendados pelos herbalistas italianos, para reduzir eficazmente a glicémia. Alguns estudos têm demonstrado a atividade hipoglicemiante do extrato do cato *Opuntia* em ratos não diabéticos, com diabetes induzida, ou em humanos diabéticos.^[5]

Segundo Hassan et al.^[25], o tratamento de ratos diabéticos com uma ou mais doses de sumo do fruto, reduz significativamente os níveis de glucose sérica e de colesterol total, quando comparados com os grupos de controlo. O melhor tratamento verifica-se com doses repetidas do sumo. O efeito hipoglicemiante das plantas pode ser devido à presença de substâncias “insulina-like”, da estimulação de células β para produzir mais insulina, do aumento da ação da insulina e da sua ligação a outras moléculas, do aumento do metabolismo da glucose, da presença elevada de fibras que interferem com a absorção de hidratos de carbono, e do efeito de regeneração no tecido pancreático.

2.3.5 Efeito nas lipoproteínas plasmáticas

Segundo Hassan et al.^[25], os níveis séricos da lipoproteína de alta densidade (HDL), em ratos diabéticos aumenta consoante o número de doses de sumo do fruto, sendo uma vantagem, uma vez, que esta lipoproteína é responsável pelo transporte de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, de modo a ser metabolizado. Isto faz com que o sumo do fruto tenha potencial para prevenir a arteriosclerose e doenças cardíacas coronárias.

2.3.6 Outros efeitos

Partes da planta *Opuntia*, como o fruto, cladódios e flores, têm vindo a ser tradicionalmente utilizadas na medicina tradicional para tratar patologias, tais como, úlceras, alergias, fadiga e reumatismo, e como agente diurético e antiúrico. Efeitos apaziguadores dos sintomas de ressaca alcoólica têm sido reportados recentemente, e associados à diminuição da resposta inflamatória após consumo excessivo de álcool. De todos os extratos contendo flavonóides, de cladódios e frutos, o flavonóide 3-metil quercetina aparenta ser o neuroprotetor mais eficaz.^[5]

Recentemente, foi reportado o efeito protetor do sumo do fruto contra o tetracloreto de carbono (CCl₄), que induz hepatotoxicidade em ratos. Este efeito foi verificado através da diminuição das transaminases, nomeadamente das aminotransferases de alanina e aspartato, em ratos tratados com CCl₄, após administração do sumo.^[26]

3. Materiais e métodos

3.1 Amostra

Os ecótipos laranja e roxa, do fruto *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill são provenientes de uma exploração situada no Sabugueiro, cujo produtor é o Sr. Paulo Ramos e foram colhidos em Agosto de 2015, tendo sido posteriormente conservados em caixas de fruta, a uma temperatura entre 15-18 °C. As plantas são de origem Siciliana e o pomar tem cerca de 3 anos, tendo sido plantado a Julho de 2013.

Os frutos foram enviados para a Universidade do Algarve, uma semana após a colheita, onde foram selecionados e realizadas as primeiras análises nomeadamente a observação morfológica, cor (CIELa*b*), firmeza, o teor de sólidos solúveis (Brix°) e a acidez titulável. As restantes análises foram realizadas após a conservação dos frutos a -80°C.

3.2 Reagentes

O ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB ou reagente de Ellman), enzima acetilcolinesterase (tipo VI-S) da *Electrophorus electricus*, iodeto de acetiltiocolina (ACTI), fostato trissódico, e o ácido (±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic (Trolox®) foram obtidos pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O reagente Tris-HCl foi obtido pela VWR Chemicals (Lovânia, Bélgica). O ácido clorídrico 37%, e o ácido sulfúrico 95%, foram obtidos pela Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido). O reagente metanol (99,86%) foi obtido pela Chem-Lab (Zedelgem, Bélgica). O molibdato de amónio, o hidróxido de sódio, e o carbonato de sódio anidro, foram obtidos pela Pronalab (Lisboa, Portugal). O reagente Folin-Ciocalteu foi obtido pela Merck (Darmstadt, Alemanha). O ácido gálico foi obtido pela Riedel-de-Haen (Seelze, Alemanha). O reagente ABTS [2,29-azinobis-(3ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)],

foi obtido pela Panreac Química (Barcelona, Espanha). O reagente persulfato de potássio, foi obtido pela ACROS Organics (Nova Jersey, USA).

Para a análise em HPLC-MS, o reagente n-hexano foi obtido pela LabScan (Dublin, Irlanda). O reagente metanol (LiChrosolv, HPLC grau de gradiente), obtido pela Merck (Darmstadt, Alemanha). O metanol e o acetonitrilo, para gradiente HPLC, foram obtidos pela VWR Chemicals (Lovânia, Bélgica). O acetato de etilo foi obtido pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e o clorofórmio pela Panreac Química (Barcelona, Espanha). O padrão rotina a 97% foi obtido pela ACROS Organics (New Jersey, USA). A água foi obtida pelo sistema Millipore Milli-Q (Bedford, MA, EUA). A areia foi colhida na praia de Faro, em Faro, e previamente analisada, de modo a verificar, se era essencialmente constituída por quartzo, em vez de conchas e pedras.

3.3 Propriedades físico-químicas e observação morfológica do fruto *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill

3.3.1 Observação morfológica

Foram escolhidos 30 frutos da espécie *Opuntia ficus-indica* e observados os dados correspondentes ao comprimento (mm), diâmetro (mm), peso da polpa (g), peso da casca (g); calculada pela equação: peso total (g) - peso polpa (g), e firmeza (N), determinada através de um texturómetro, com um êmbolo cilíndrico de 11 mm, a uma profundidade de 7 mm (Chatillon Force TCD 200 e Digital Force Gauge DFIS 50 Largo, FL, EUA).

A cor foi determinada através de um colorímetro (CR-300 series, CE Minolta, Japão), que analisa a cor e classifica-a numericamente quanto ao brilho, cor e saturação. O aparelho foi previamente calibrado numa superfície branca de acordo com padrões pré-estabelecidos ($x = 0.3133$; $y=0.3193$; $Y= 93.0$), na escala de classificação CIELab (L^* , a^*b^*), em que L^* , representa o grau de luminosidade e compreende o branco ($L^*=100$) e o preto ($L^*=0$). O parâmetro a^* varia entre o verde ($-a^*$) e o vermelho ($+a^*$), e o parâmetro b^* caracteriza desde a cor azul ($-b^*$), à cor amarelo ($+b^*$). Posteriormente foi calculado o Chroma (C^*) que representa a saturação da cor ou intensidade e o ângulo Hue (h°), que foram calculados a partir dos valores de a^* e b^* , através das fórmulas: [27]

$$Hue(h^*) = SE(a^* > 0; \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \times \frac{180}{3,1416}; \arctan(b^* a^*) \times \frac{180}{3,1416} + 180$$

$$Croma(C *) = \sqrt{a *^2 + b *^2}$$

Posteriormente foram colocadas em seis copos, pequenas porções com cerca de 10 g ao todo, de frutos diferentes, nomeadamente três copos com porções de casca e três copos com porções de polpa. Cada copo funcionou como uma repetição. De seguida, foram adicionados 10 mL de água desionizada a cada copo, e macerou-se com o ultraturrax (IKA, Starfen, Alemanha), de modo, a homogeneizar. Seguidamente, a amostra foi centrifugada a 5000 rpm, durante 5 min, e o sedimento descartado. O sobrenadante obtido foi utilizado para a determinação do pH inicial através de um potenciómetro Basic 20 (Crison, Barcelona, Espanha), previamente calibrado com tampões a pH 4 e 7.

3.3.2 Determinação do teor de sólidos solúveis (Brix^o)

O teor de sólidos solúveis da polpa do fruto foram medidos com um refratómetro (Model PR-100, Atago Co., Tóquio, Japão), juntando uma gota de sumo sobre o refratómetro, à temperatura ambiente, e expressos em % Brix^o.^[28]

3.3.3 Quantificação da acidez titulável

As amostras foram tituladas com 0,1 M de NaOH até pH 8,2. A acidez titulável foi expressa em equivalentes de ácido cítrico.^[28]

3.4 Preparação e extração do fruto *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill

Uma vez separada manualmente, a polpa e a casca do ecótipo laranja e roxo do fruto, foram formados três replicados de cada uma. De seguida, foram colocadas a -80°C, e posteriormente no liofilizador (Labconco Freezone 6 plus, Cidade de Kansas, EUA).

Após a desidratação completa das amostras, procedeu-se à realização de duas extrações diferentes, cada uma utilizando água e metanol a 50%, como solvente.

Na primeira extração, pesaram-se inicialmente, 0,1 g de cada amostra, à qual se adicionaram 10 mL de água desionizada. De seguida, procedeu-se à agitação no vórtex durante 2 minutos, e centrifugou-se numa microcentrífuga (HETTICH UNIVERSAL 320 R Benchtop, Tuttlingen, Alemanha), a 12000 rpm, durante 15 minutos a 15°C. O sedimento foi descartado e repetiu-se a centrifugação com o sobrenadante obtido anteriormente, de maneira a substituir a filtração, e tornar a solução mais límpida.^[29] O sobrenadante obtido foi devidamente rotulado e conservado para posterior análise. Esta extração foi repetida, mas utilizando metanol a 50%, como solvente.

Na segunda extração, pesou-se 1 g de cada amostra à qual se adicionou 5 mL de metanol a 50%. De seguida, macerou-se com o ultraturrax (IKA T18, Starfen, Alemanha) e depois centrifugou-se duas vezes a 5000 rpm, durante 5 minutos, sendo o sedimento descartado por duas vezes, e o sobrenadante aproveitado e no fim devidamente rotulado e conservado para posterior análise. Esta extração foi repetida, mas utilizando água desionizada como solvente, e a amostra suspendida em 10 mL, em vez de 5 mL, como descrito anteriormente.

3.5 Quantificação de compostos bioativos presentes no fruto *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill

3.5.1 Fenóis totais

O teor de polifenóis total dos extratos resultantes da segunda extração, foi determinado em triplicado, através da utilização do método colorimétrico Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton e Rossi.^[30]

Foram colocados 20 µL de amostra diluída (1:8, v/v) nos respetivos poços da microplaca e seguidamente adicionados 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu diluído (10 mL Folin-Ciocalteu:90 mL água) e 80 µL de Na₂CO₃ (7,5g Ca₂CO₃:100 mL água). Aguardaram-se cerca de 30 minutos e realizou-se a leitura a 765 nm, no leitor de microplacas (Tecan Infinite M200, Männedorf, Suíça).

Para a quantificação foi utilizada uma curva de calibração através de soluções padrão de ácido gálico, com concentrações compreendidas entre 0,6 e 0,00078 mg/mL. O teor de polifenóis total foi expresso em mg equivalentes de Ácido Gálico (EAG)/g.

3.5.2 Betalaínas

O teor de betalaínas dos extratos resultantes da primeira extração, foi determinado em triplicado, através da leitura das amostras diluídas (1:4, v/v) a 535 e 483 nm, de modo a determinar betacianinas e betaxantinas, respetivamente. Esta leitura foi realizada num espectrofotómetro UV/Vis (Shimadzu Corporation, UV-160A, Kyoto, Japão), previamente programado, com um espectro de absorção entre 200 e 700 nm. O teor de betalaínas foi expresso em mg/g.^[29]

3.6 Identificação de compostos bioativos presentes no fruto *Opuntia Ficus-indica* (L.) Mill, por HPLC-MS

3.6.1 Extração SSDM (sea sand disruption method)

As amostras dos dois ecótipos, compostas por casca e polpa em separado, foram novamente liofilizadas no liofilizador LyoQuest-85 (Telstar, Terrasa, Espanha), após um período de congelamento a -80°C. Após desidratação completa, procedeu-se à realização da extração através do método de disrupção com areia do mar (SSDM: sea sand disruption method), baseado no método (MSPD: matrix solid phase dispersion), e descrito por Teixeira et al.^[31]

A areia do mar foi previamente lavada várias vezes com água desionizada e três vezes com metanol, sendo posteriormente seca antes de ser utilizada. Uma amostra de casca ou polpa de 0,5 g foi pesada e colocada num almofariz de vidro, com 2 g de areia do mar. Os materiais foram misturados no almofariz de vidro, de modo a obter uma mistura homogénea. Adicionaram-se 2 mL de *n*-hexano e macerou-se até a mistura secar totalmente. Esta foi transferida para um seringa de plástico de 5 mL, com 3 círculos de papel de filtro na parte inferior da mesma. Outros 3 círculos de papel de filtro foram colocados por cima da mistura e lentamente tudo foi comprimido, utilizando o êmbolo da seringa.

Os fenóis foram então extraídos utilizando 10 mL de uma mistura trifásica de clorofórmio:metanol:água (65:10:1, v/v), e a seguir 10 mL de metanol:água (8:2, v/v). Todos os extratos foram secos, redissolvidos em 5 mL de água, filtrados através de um filtro PTFE (politetrafluoroetileno) de 0,45 µm, e injetados no sistema HPLC.

Os solventes descritos anteriormente foram baseados num procedimento otimizado. Durante os ensaios de otimização, foi seguido um procedimento experimental semelhante, mas com diferentes solventes [1- acetato de etilo, 2- metanol:acetato de etilo (1:1, v/v), 3- metanol:água (8:2, v/v); 1- acetato de etilo:metanol (1:1, v/v), 2- metanol:água (8:2, v/v); 1- metanol:ácido acético (99:1, v/v), 2- metanol:agua (8:2, v/v)].

3.6.2 Análise “high performance liquid chromatography coupled to photodiode array detector” (HPLC-DAD)

Foi utilizado um sistema HPLC (Surveyor Thermo Finnigan), com um sistema automático de colheita de amostras (autosampler), e um detetor *Diode Array* (DAD). Foi utilizada uma coluna de fase reversa foi uma Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (rápida resolução, 150 mm x 4,6 mm ID, 3,5 µm de tamanho de partícula). A temperatura da coluna foi fixada nos 30°C e a temperatura do tabuleiro de amostras a 27 °C. A separação cromatográfica foi realizada com a fase móvel constituída por: solvente A – solução de ácido fórmico 0,1% ou 1,5 (v/v); solvente B – acetonitrilo, em que foi utilizado o seguinte programa de eluição: gradiente linear dos 0 aos 60% de solvente B (0-60 min), e de 60 a 80% de solvente B (60-80 min). Volume de injeção: 10 µL, caudal: 0,2 mL/min. A gama de comprimentos de onda utilizada foi entre 200-800 nm.

3.6.3 Análise “liquid chromatography-electrospray ionization - tandem mass spectrometry” (LC-ESI-MS/MS)

A análise LC-ESI-MS/MS foi realizada num espectrómetro de massa LCQ Fleet Thermo Finnigan, equipado com ionização por eletrospray e com um analisador de massa de captura de iões. Foi controlado pelo software Xcalibur (ThermoFinnigan). As condições de espectroscopia de massa foram: temperatura capilar 300° C, uma tensão de 5,0 kV, intensidade de corrente 100,0 µA, e voltagem do capilar 14,0 V no modo positivo, e -7.0 V no modo negativo. Os analitos foram detetados em modo MS total (100-1500 *m/z*), no modo positivo e negativo.

3.7 Determinação da atividade antioxidante do fruto *Opuntia ficus-indica* (L.)

Mill

3.7.1 Método de captação de radicais ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acide)]

O método de captação de radicais ABTS, descrito por Re et al.^[32], foi utilizado em ambos os extratos, analisada em triplicado.

Para o extrato metanólico da variedade laranja foi utilizada a diluição (1:4) para a casca, e para a polpa a amostra sem diluição. Já para a variedade roxa foi utilizada a amostra sem diluição para casca e polpa. Relativamente aos extratos aquosos do ecótipo roxo e laranja, foi utilizada a diluição (1:2, v/v) para a casca, e para a polpa a amostra sem diluição.

Inicialmente, juntou-se a solução de ABTS (0,19 g: 100 mL água ultra-pura) com a solução de persulfato de potássio (0.0662 g: 100 mL água ultra-pura), e deixou-se repousar no escuro durante cerca de 16 h. A solução diária consiste em adicionar álcool a 96% à solução preparada anteriormente até se obter uma absorvância entre 0,7 e 0,8.

Nos respetivos poços da microplaca foram colocados 197 µL da solução diária e foi efetuada a leitura a 735 nm no leitor de microplacas, de modo a determinar o A_0 . De seguida adicionou-se 3 µL de amostra e colocou-se a microplaca no escuro a repousar, durante 6 minutos. Após o tempo de repouso foi feita a leitura no leitor de microplacas (Tecan Infinite M200, Männedorf, Suíça) a 735 nm, de modo a determinar o A_1 . Efetuou-se o cálculo da percentagem de inibição, que se expressa pela seguinte fórmula:

$$\frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Através de soluções padrão de Trolox e etanol a 96%, com concentrações compreendidas entre 156,25 e 2500 µM, e da respetiva curva de calibração, quantificou-se a atividade antioxidante. Esta foi expressa em µmol Trolox/g.

3.7.2 Método de redução de Mo(VI) a Mo(V)

O método de redução de Mo(VI) a Mo(V), descrito por Prieto et al.^[33], foi utilizado em ambos os extratos, e cada amostra diluída (1:8, v/v) e não diluída analisada

em triplicado. Para os ecótipos roxos de ambos os extratos, assim como o ecótipo laranja do extrato metanólico, foi utilizada a amostra com diluição (1:8, v/v) e para o ecótipo laranja do extrato aquoso foi utilizada a amostra sem diluição.

Foi preparada uma solução de molibdato [Fosfato de sódio (28 mM); molibdato de amónio (4 mM); ácido sulfúrico 10%], e adicionado 1 mL desta a 25 µL de amostra. De seguida, colocou-se a solução em banho-maria a 95°C, durante uma hora. Após o banho deixou se arrefecer e procedeu-se à leitura das amostras a 695 nm, num espectrofotómetro UV/Vis (Shimadzu UV-160A, Quioto, Japão).

Para a quantificação da atividade foram feitas curvas de calibração para os extratos aquoso e metanólico, através de soluções padrão de ácido ascórbico com concentrações compreendidas entre 2,13-0,18 mg/mL, e 2,14-0,48 mg/mL, respetivamente. A quantificação da atividade foi expressa em mg equivalentes ácido ascórbico (EAC)/g.

3.8 Capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase pelo fruto *Opuntia Ficus-indica* (L.) Mill

O método de inibição da enzima acetilcolinesterase, descrito por Mata et al.^[34], foi utilizado em ambos os extratos, e cada amostra analisada em duplicado.

Começou por se preparar uma solução de enzima 0,298 U/mL, e solução tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8). Nos respetivos poços da microplaca colocaram-se 25 µL de amostra e 40 µL de solução tampão Tris-HCl. De seguida, adicionaram-se 60 µL de enzima e incubou-se à temperatura ambiente durante 15 minutos. Após incubação, adicionaram-se 50 µL de substrato iodeto acetilcolina e 125 µL de ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB). Levou-se novamente a incubar durante 30 minutos, à temperatura ambiente, e quando terminada, mediu-se a absorvância a 405 nm no leitor de microplacas (Tecan Infinite M200, Männedorf, Suíça).

O processo foi repetido, sem a adição da enzima, de modo a se poder retirar a absorvância por parte da amostra, pois devido à sua cor alaranjada, absorve no comprimento de onda a que é realizada a medição. Foram, também, realizados controlos positivos e negativos, em que os controlos positivos continham enzima e os negativos não. Ambos os controlos não continham amostra.

A quantificação da atividade foi feita através do cálculo da percentagem de inibição que se expressava pela seguinte fórmula:

$$\frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

em que, A_0 consiste na absorvância resultante da subtração dos controlos positivo e negativo, e A_1 na absorvância resultante da subtração da amostra com e sem enzima. O resultado obtido é expresso em %.

3.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa informático Excel (Microsoft Office 2010), para a elaboração de cálculos, gráficos e tabelas. Com o objetivo de se testarem diferenças entre casca e polpa, e entre os dois extratos, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), com testes Post Hoc, nomeadamente DMS e B de Tukey, aplicados a todos os resultados, utilizando o programa informático IBM SPSS Statistics 23.0. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão, com uma diferença média significativa para $p > 0,05$.

4. Resultados e discussão de resultados

4.1 Propriedades físico químicas e observação morfológica do fruto *Opuntia Ficus-indica* (L.) Mill

Algumas das características físicas estão representadas nos Quadros 4.6 e 4.7, nomeadamente o comprimento, diâmetro, peso, firmeza e cor dos frutos dos ecótipos roxo e laranja. De acordo com os resultados obtidos é possível verificar que há uma diferença relativamente elevada nestes parâmetros, dado que o ecótipo roxo apresenta valores mais elevados em comprimento médio 77,2 mm, diâmetro médio 48,6 mm, peso da casca médio 45,1 g, peso da polpa médio 66,1 g e firmeza média 40,3 N, comparativamente ao ecótipo laranja que possui um comprimento médio de 68,2 mm, diâmetro médio de 45,5 mm, peso de casca médio de 30,0 g, peso de polpa médio de 51,4 g e uma firmeza de 37,8 N. No entanto estes resultados não coincidem com os observados na literatura, pois

segundo Stintzing et al.^[28], tanto o comprimento como o peso da casca e polpa do fruto são superiores no ecótipo laranja, o que se pode justificar por condições edafo-climáticas diferentes das dos frutos do presente ensaio.

No entanto, os valores de peso de polpa médio, para os dois ecótipos, e o valor médio correspondente ao peso da casca, para o ecótipo roxo, encontram-se dentro do intervalo observado por Parish et al.^[35], para vários ecótipos do fruto. O valor de peso de casca médio, para o ecótipo laranja já se encontra fora dos valores observados.

Quadro 4.6 - Alguns parâmetros dos ecótipos roxo e laranja do fruto *Opuntia ficus-indica*

Fruto	Parâmetros	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)	Peso casca (g)	Peso polpa (g)	Firmeza (N)
Roxo	Média	77,2	48,6	45,1*	66,1*	40,3
	DP	6,6	3,1	11,1*	13,0*	10,4
	Min	62,5	41,2	13,7*	40,1*	21,4
	Máx	92,5	54,1	72,3*	85,6*	60,6
Laranja	Média	68,2	45,5	30,0	51,4	37,8
	DP	3,6	3,0	7,2	11,3	6,9
	Min	62,2	37,8	13,0	19,6	26,6
	Máx	79,9	51,0	54,2	70,0	55,4

*Valores obtidos para 29 amostras, em vez de 30.

Após a análise dos resultados obtidos, demonstrados no Quadro 4.7, verifica-se que ambos os ecótipos apresentam colorações significativamente diferentes, uma vez que apresentam cores bastante distintas. Para o ecótipo roxo verificou-se uma luminosidade (L^*) de 44,3 para a casca e 35,1 para a polpa. Relativamente à intensidade da cor (C^*), observam-se valores de 20,9 para a casca e 30,5 para a polpa, e no caso do ângulo Hue (h°), este posiciona-se em média a $28,9^\circ$, e a $32,7^\circ$ para a polpa, que corresponde à cor entre o vermelho e o laranja.

Para o ecótipo laranja observaram-se valores superiores em todos os parâmetros. A luminosidade (L^*) apresenta um valor de 56,3 para a casca e 40,9 para a polpa. Relativamente à intensidade da cor (C^*), observam-se valores de 31,6 para a casca e 308,2 para a polpa, e no caso, do ângulo Hue (h°), esta posiciona-se a $67,5^\circ$ (h°) para a casca, e a 75° para a polpa, correspondendo à cor mais para o amarelo.

Quadro 4.7 - Parâmetros da cor dos ecótipos roxos e laranja do fruto *Opuntia ficus-indica*

Fruto	Parâmetros	Cor casca			Cor polpa		
		L*	Chroma (C*)	Hue (h°)	L*	Chroma (C*)	Hue (h°)
Roxo	Média	44,3	20,9	28,9	35,1	30,5	32,7
	DP	2,4	2,9	10,7	6,2	6,2	7,5
	Min	40,4	16,0	18,0	7,5	14,1	23,7
	Máx	49,4	25,4	68,0	36,5	40,1	57,8
Laranja	Média	56,3	31,6	67,5	40,9	38,2	75,0
	DP	2,4	2,4	6,0	4,7	5,4	5,2
	Min	52,5	27,8	54,5	31,0	27,3	59,3
	Máx	60,3	36,2	82,1	50,1	48,4	84,3

Os resultados obtidos neste trabalho experimental são significativamente semelhantes aos encontrados na literatura por Yahia et al.^[27], que apresenta para o sumo da polpa de diferentes ecótipos, uma luminosidade entre 23 e 58, uma intensidade de cor entre 14,67 e 35,18, e a cor posiciona-se entre 11,30° e 353,61°. Os resultados obtidos encontram-se assim entre os intervalos observados por estes autores. Segundo Cejudo-Bastante et al.^[16], a luminosidade da cor para a polpa do ecótipo amarelo consiste em 84,8, a intensidade da cor em 54,5 e a cor localiza-se a 85,2°, sendo valores significativamente diferentes dos resultados observados para a polpa dos dois ecótipos, à exceção da posição da cor para a polpa do ecótipo laranja, que está ligeiramente próxima.

Para o fruto todo do ecótipo amarelo os autores reportam valores de luminosidade da cor de 88,7, de intensidade de cor de 57,1 e a cor posiciona-se a 84,7°, indicando assim valores significativamente diferentes aos resultados observados para a casca e polpa dos ecótipos laranja e roxo, com exceção, mais uma vez, da posição da cor da polpa do ecótipo laranja. Em relação à polpa do ecótipo vermelho, os autores observaram valores de luminosidade da cor de 80,8, de intensidade de cor 61,1 e a posição da cor a 81,8, observando-se mais uma vez uma diferença significativa comparativamente aos resultados observados para a polpa dos dois ecótipos, com a exceção da posição da cor para a polpa do ecótipo laranja que é ainda mais semelhante. Finalmente, para o fruto todo do ecótipo vermelho, os autores, observaram valores para a luminosidade da cor de 88,7, para a intensidade da cor de 54,9 e para a posição da cor 83,4, verificando-se assim a mesma situação.

Segundo Hassan et al.^[16], a cor para o sumo da polpa do ecótipo amarelo/laranja, encontra-se a 62,95°, sendo significativamente diferente da posição observada para a

polpa do ecótipo laranja, mas semelhante à encontrada na casca do mesmo ecótipo. Já a luminosidade da cor, para os autores foi de 23,14, sendo diferente da observada para a polpa e casca do ecótipo laranja. Finalmente, para a intensidade da cor reportou-se um valor de 42,02, que já é significativamente semelhante ao observado para a polpa do ecótipo laranja.

Stintzing et al.^[36], reportou valores, para o sumo da polpa do ecótipo roxo de luminosidade da cor de 60,6, de intensidade de cor de 58,9 e de posição da cor de 347,2, sendo bastantes diferentes daqueles observados para a polpa e casca do ecótipo roxo. Para sumo da polpa do ecótipo laranja reportaram valores de luminosidade da cor de 78,6, de intensidade da cor de 45,7 e para a posição da cor de 80,2°, verificando-se assim alguma semelhança nos valores observados para a intensidade da cor e posição da polpa do ecótipo laranja.

Relativamente aos restantes parâmetros, representados no Quadro 4.8, nomeadamente, os sólidos solúveis totais (°Brix), verificaram-se valores médios para casca e polpa semelhantes, entre os dois ecótipos, 12,9 para casca e 12,4 para polpa do ecótipo roxo, e 11,9 para casca e 12,4 para polpa, do ecótipo laranja. A polpa de ambos os ecótipos apresentou exatamente o mesmo valor médio de °Brix. A casca apresentou alguma diferença, embora mínima. Estes valores encontram-se dentro dos observados na literatura, que variam entre os 11° e 16°, sendo os mais elevados correspondentes a frutos mais doces.^{[28] [36] [37]}

Quadro 4.8 - Alguns parâmetros dos ecótipos roxos e laranja do fruto *Opuntia ficus-indica*

Fruto	Parte do fruto	Parâmetros	°Brix	pH inicial	Acidez Titulável (mmol/L)	Acidez Titulável (%)
Roxo	Casca	Média	12,9	6,3	1,7	0,030
		DP	1,5	0,1	0,3	0,006
		Min	11,2	6,2	1,4	0,027
		Máx	13,8	6,3	2,0	0,038
	Polpa	Média	12,4	5,6	3,6	0,068
		DP	1,8	0,1	0,1	0,002
		Min	10,8	5,6	3,5	0,067
		Máx	14,4	5,6	3,7	0,070
Laranja	Casca	Média	11,9	6,1	1,6	0,030
		DP	0,6	0,0	0,3	0,005
		Min	11,2	6,1	1,4	0,030
		Máx	12,4	6,1	0,1	0,036
	Polpa	Média	12,4	5,4	2,8	0,053
		DP	1,8	0,1	1,2	0,023
		Min	10,8	5,3	1,5	0,030
		Máx	14,4	5,5	4,0	0,076

Os valores médios de pH observados nesta análise experimental variam entre os 5,4 e os 6,3. No ecótipo roxo do fruto verificou-se um valor médio de pH, para a casca de 6,3, e para a polpa 5,6. Já para o ecótipo laranja observaram-se valores médios de pH, para a casca de 6,1 e 5,4 para a polpa. Os valores médios de pH são semelhantes entre casca e polpa, dos dois ecótipos, e semelhantes aos verificados na literatura, uma vez que esta apresenta valores entre 5,6 e 6,5. ^[25] ^[35] ^[36] No entanto, Khrassi et al. ^[28], apresentam valores abaixo dos demonstrados pelos outros autores, entre 3,3 e 4,8, e salientam que este facto pode ser devido a fatores ambientais, e que valores mais baixos de pH são importantes, pois inibem o crescimento de agentes patogénicos. Neste caso o ecótipo laranja é mais favorecido, por possuir um pH mais baixo, comparativamente ao ecótipo roxo.

Para a acidez titulável, verificaram-se valores médios entre 1,6 e 3,6 mmol/L (0,03% e 0,068%), sendo que o ecótipo roxo apresenta valores superiores, uma vez que para a casca, verificaram-se valores médios de acidez titulável de 1,7 mmol/L (0,03%) e para a polpa 3,6 mmol/L (0,068%). Para a casca do ecótipo laranja verificaram-se valores médios de acidez titulável de 1,6 mmol/L (0,03%), e para a polpa 2,8 mmol/L (0,053%). Assim, é possível observar que os valores são significativamente semelhantes entre as cascas dos dois ecótipos e significativamente diferentes entre as polpas. Observa-se

também que as polpas possuem valores superiores aos da casca, principalmente para o ecótipo roxo. Estes resultados observados demonstram ser semelhantes aos valores observados na literatura, por Saenz,^[38] que reporta valores de acidez titulável entre 0,03% e 0,04% para o ecótipo roxo. Gurrieri et al.^[39], demonstra valores de casca de acidez titulável de 0,11% para o ecótipo vermelho, 0,12% para o ecótipo amarelo e 0,14% para o ecótipo branco, que se revelam superiores aos resultados obtidos. Para o sumo resultante da polpa, reporta valores de acidez titulável de 0,02% para os três ecótipos, que contrariamente à casca, são valores inferiores aos resultados observados neste trabalho. Já Hassan et al.^[25], reporta valores de acidez titulável de 0,055% para o sumo resultante da polpa do ecótipo laranja/amarelo, ou seja, valores muito semelhantes aos resultados observados no presente trabalho. Kharrassi et al.^[28], demonstra valores entre 0,17 e 0,88 mmol/L de acidez titulável para o sumo resultante da polpa dos ecótipos amarelo/laranja e roxo, que se revelam inferiores aos resultados observados. Estes autores referem também, a importância de valores elevadas de acidez titulável no processamento de fruta, uma vez que permite a redução da utilização de acidificantes artificiais.

Segundo Alvez et al.^[6], a acidez, pH e sólidos solúveis totais (°Brix), revelaram ser fundamentais para a determinação do estágio ótimo de colheita, consumo e seleção de matéria-prima para fins industriais.

4.2 Quantificação de compostos bioativos presentes no fruto *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill

4.2.1 Fenóis totais

Os polifenóis incluem várias classes de compostos que estão presentes em vários alimentos e que podem ser responsáveis por várias propriedades biológicas, como por exemplo, a atividade antioxidante.^[40] Um exemplo é o fruto *Opuntia ficus-indica*, que é rico em compostos bioativos antioxidantes, incluindo fenóis, que lhe confere benefícios nutricionais e promotores de saúde.^[4]

O ensaio Folin-Ciocalteu é um método bastante difundido na agroquímica e indústria alimentar, devido à sua simplicidade, e à utilização de reagentes relativamente baratos. Este método é utilizado, há vários anos, para medir o teor de fenóis totais em compostos naturais, em meio alcalino. Nestas condições, os fenóis são capazes de reduzir

o ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico, de cor amarela, e transformá-lo num complexo azul, o qual é detetado espectrofotometricamente. No método original, o tampão carbonato, era utilizado para ajustar o pH, e o fim da reação era obtido após 120 min à temperatura ambiente. Este intervalo de tempo, relativamente grande, impedia que o método fosse aplicado regularmente, apesar da sua simplicidade. A cinética da reação aumenta com o aumento da concentração do reagente Folin-Ciocalteu, da alcalinidade, temperatura da reação, e diferentes concentrações de carbonato. Assim, têm sido utilizadas algumas destas alterações ao método inicial, de modo, a obter uma diminuição do tempo necessário para que a reação ocorra.^[41]

No extrato metanólico observaram-se concentrações médias para a casca do ecótipo roxo de 25,8 mg/g e para a polpa 10,3 mg/g. Para a casca do ecótipo laranja observaram-se concentrações médias de 44,6 mg/g e 11,7 mg/g para a polpa. Assim, entre os dois ecótipos do extrato metanólico, verifica-se que o ecótipo laranja possui valores mais elevados, tanto para a casca, como para a polpa, embora as concentrações médias das polpas dos dois ecótipos sejam significativamente semelhantes entre si (Quadro 4.9).

Quadro 4.9 - Quantificação dos fenóis totais e de betalaínas dos ecótipos roxo e laranja do fruto *Opuntia ficus-indica*

Extrato	Fruto	Parte do fruto	Betalaínas (mg/g)		Betalaínas (mg/L)		Fenóis totais (mg (EAG)/g)
			Betaninas (535 nm)	Indicaxantinas (473 nm)	Betaninas (535 nm)	Indicaxantinas (473 nm)	
Metanol	Roxo	Casca	3,34 ± 0,47 ^c	0,55 ± 0,05 ^{ab}	33,40 ± 4,68 ^c	5,52 ± 0,52 ^{ab}	25,8 ± 2,8 ^b
		Polpa	0,46 ± 0,06 ^a	0,20 ± 0,05 ^a	4,57 ± 0,55 ^a	1,98 ± 0,48 ^a	10,3 ± 1,0 ^a
	Laranja	Casca	3,12 ± 0,11 ^c	1,91 ± 1,04 ^{bc}	31,23 ± 1,10 ^c	19,06 ± 10,37 ^{bc}	44,6 ± 4,7 ^c
		Polpa	0,47 ± 0,07 ^a	0,74 ± 0,09 ^{ab}	4,69 ± 0,71 ^a	7,36 ± 0,93 ^{ab}	11,7 ± 0,3 ^a
Água	Roxo	Casca	3,98 ± 0,32 ^d	1,24 ± 0,38 ^{abc}	39,75 ± 3,17 ^d	12,35 ± 3,84 ^{abc}	45,5 ± 6,1 ^c
		Polpa	1,29 ± 0,20 ^b	0,64 ± 0,02 ^{ab}	12,85 ± 2,04 ^b	6,37 ± 0,23 ^{ab}	16,2 ± 1,3 ^{ab}
	Laranja	Casca	0,39 ± 0,08 ^a	2,28 ± 0,89 ^c	3,91 ± 0,77 ^a	22,84 ± 8,87 ^c	52,7 ± 10,2 ^c
		Polpa	0,09 ± 0,005 ^a	1,25 ± 0,36 ^{abc}	0,86 ± 0,05 ^a	12,51 ± 3,57 ^{abc}	15,0 ± 0,4 ^{ab}

Na mesma coluna as amostras com a mesma letra, não são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

Em relação ao extrato aquoso, verificaram-se concentrações médias, para a casca do ecótipo roxo de 45,5 mg/g e para a polpa 16,2 mg/g. Para a casca do ecótipo laranja, observaram-se concentrações médias de 52,7 mg/g e para a polpa 15,0 mg/g. Assim, entre os dois ecótipos do mesmo extrato, é possível observar, que tal como no extrato metanólico, o ecótipo laranja apresenta valores mais elevados, pelo menos para a casca.

No entanto, os valores obtidos para as cascas dos dois ecótipos são significativamente semelhantes entre si, sendo que, o mesmo acontece para as polpas (Quadro 4.9).

Entre extratos, é possível verificar que a casca do ecótipo laranja apresenta valores superiores e significativamente semelhantes entre si, embora o mesmo não se verifique para as restantes partes dos dois ecótipos. Observa-se sim, que no extrato aquoso há quase sempre valores mais elevados de fenóis totais, quer para a casca quer para a polpa em ambos os ecótipos, quando comparada com o extrato metanólico.

Segundo Yahia et al.^[37], os valores encontrados de fenóis totais para polpas de vários ecótipos do fruto de *Opuntia ficus-indica* situavam-se entre os 10 mg (EAG)/g e os 130 mg (EAG)/g, verificando-se que os valores obtidos neste trabalho experimental, encontram-se dentro do intervalo reportado por estes autores.

Albano et al.^[4] descreveram valores de fenóis totais para a polpa do ecótipo laranja de 89,2 mg (EAG)/100 g e de 69,8 mg (EAG)/100 g para a polpa do ecótipo roxo. Estes resultados são inferiores aos observados neste trabalho experimental, embora também tenham encontrado um valor de fenóis totais maior para o ecótipo laranja. Tal como estes autores também Fernández López et al.^[42] obtiveram valores de fenóis totais inferiores aos resultados obtidos no presente trabalho (218,8 mg (EAG)/100 g para o extrato de fruto inteiro de *Opuntia ficus-indica*, do ecótipo vermelho. Também Stintzing et al.^[36] encontraram valores inferiores de fenóis totais aos obtidos neste trabalho experimental (247 mg (EAG)/L, para o sumo da polpa do ecótipo laranja e 660 mg (EAG)/L para o sumo da popa do ecótipo roxo).

4.2.2 Betalaínas

O fruto *Opuntia ficus-indica* é caracterizado por várias cores, devido à combinação de dois pigmentos de betalaínas, o pigmento vermelho/roxo e o pigmento amarelo/laranja, que correspondem às betaninas e indicaxantinas, respetivamente.^[43]

A quantificação das betalaínas nos extratos metanólicos e aquosos de ambos os ecótipos, foi realizada através da sua medição espectrofotométrica a 535 nm, no caso das betacianinas (betaninas), e a 473 nm, no caso das betaxantinas (indicaxantinas). Para esta quantificação foi utilizada a seguinte fórmula:^[29]

$$BC \left[\frac{mg}{g} \right] = \left[\frac{A. DF. MW. Vd}{\epsilon. L. Wd} \right]$$

em que A consiste na absorvância resultante da leitura a cada um dos comprimentos de onda, DF baseia-se no fator de diluição, MW na massa molar [betanina = 550 g/mol; indicaxantina = 308 g/mol], e Vd no volume de solvente utilizado. ϵ consiste no coeficientes de absortividade [betanina = 60,000 L (mol cm); indicaxantina = 60,000 L (mol cm)], L no percurso ótico (1 cm) e Wd na massa de amostra utilizada na extração. Por fim, BC consiste na concentração de betalaínas e expressa-se em mg por g de amostra.

Para a casca do ecótipo roxo, do extrato metanólico, observaram-se concentrações médias, para as betalaínas a 535 nm, de 3,34 mg/g e a 473 nm, de 0,55 mg/g (Quadro 4.9). Já para a polpa observaram-se concentrações de 0,46 e 0,20, a 535 nm e 473 nm, respetivamente. Para a casca do ecótipo laranja, verificaram-se concentrações médias de betalaínas a 535 nm de 3,12 mg/g, e a 473 nm de 1,91 mg/g, e para a polpa 0,47 mg/g e 0,74 mg/g, a 535 nm e a 473 nm, respetivamente. Assim, comparando ambos os ecótipos, dentro do extrato metanólico, observam-se valores significativamente semelhantes entre as cascas dos dois ecótipos e as polpas dos dois ecótipos a 535 nm, ou seja, para as betacianinas, embora o teor da casca do ecótipo roxo seja superior aos restantes, tal como o teor das cascas se destacam perante o das polpas. A 473 nm, nomeadamente, para as betaxantinas, os valores são significativamente diferentes entre as cascas e as polpas, dos dois ecótipos, no entanto, não existem diferenças significativas no teor de betaxantinas entre a casca do ecótipo roxo e a polpa do ecótipo laranja. Para este extrato, verificou-se um teor de betaxantinas mais elevado no ecótipo laranja, e um teor de betacianinas mais elevado para o ecótipo roxo, tal como era de esperar. O teor das cascas destacou-se novamente perante o das polpas.

Relativamente à casca do ecótipo laranja, do extrato aquoso, verificaram-se concentrações médias, para as betacianinas, de 3,98 mg/g, e para as betaxantinas de 1,24 mg/g (Quadro 4.9). Já para a polpa observam-se concentrações médias de 1,29 mg/g e 0,64 mg/g, para as betacianinas e betaxantinas, respetivamente. Para a casca do ecótipo laranja, verificaram-se concentrações médias, para as betacianinas de 0,39 mg/g, e para as betaxantinas de 2,28 mg/g. Para a polpa obtiveram-se teores de 0,09 mg/g e 1,25 mg/g, para as betacianinas e betaxantinas, respetivamente. Assim, comparando ambos os

ecótipos, para o extrato aquoso, observam-se valores significativamente diferentes entre si, nomeadamente, entre cascas e polpas do mesmo ecótipo, tanto para as betacianinas, como para as betaxantinas, com exceção, da casca e polpa do ecótipo laranja, para as betacianinas, e a casca do ecótipo roxo e a polpa do ecótipo laranja, para as betaxantinas, que são significativamente semelhantes entre si. Para este extrato, também se verificou um teor de betaxantinas mais elevado no ecótipo laranja, e um teor de betacianinas mais elevado para o ecótipo roxo, tal como era de esperar, e mais uma vez, o teor das cascas destacou-se perante o das polpas.

Ao comparar ambos os extratos, verifica-se que as concentrações das betaxantinas e betacianinas das cascas e polpas, dentro do mesmo ecótipo, são praticamente todas significativamente diferentes entre extratos, embora para as betacianinas, a casca e polpa do ecótipo laranja do extrato aquoso, assim como as polpas dos ecótipos roxo e laranja do extrato metanólico, sejam significativamente semelhantes. Para as betaxantinas, também se verifica uma semelhança significativa entre a casca do ecótipo roxo e a polpa do ecótipo laranja, ambos do extrato metanólico, e a polpa do ecótipo roxo do extrato aquoso.

A extração dos pigmentos, quando feita com água, extraiu mais betaxantinas em ambos os ecótipos, sendo que o ecótipo laranja possui um teor mais elevado de betaxantinas, nos dois extratos. Também a concentração das betacianinas foi maior no extrato aquoso, do ecótipo roxo, o mesmo não se verificando para o ecótipo laranja, onde a concentração das betacianinas foi maior no extrato metanólico (Quadro 4.9). Devido ao facto da água ter extraído mais betaxantinas, seria de esperar que o mesmo sucedesse para as betacianinas, levando à possibilidade de ter havido algum erro durante o procedimento, uma vez que o ecótipo roxo possui uma concentração mais elevada de betacianinas no extrato aquoso.

Segundo Castellanos-Santiago et al.^[29], as concentrações de betacianinas para o sumo da polpa reconstituído com água, de diversos ecótipos do fruto estão entre 0,05 e 5,29 mg/g, e as concentrações de betaxantinas estão entre 0,12 e 2,86 mg/g. Estes autores reportam uma concentração de betaxantinas superior em alguns ecótipos roxos em comparação aos ecótipos amarelos, uma vez que essa cor deriva da presença de maiores quantidades de pigmentos de betacianinas, como a betanina. Constataram também, que os ecótipos amarelo/laranja possuem maior concentração de betaxantinas comparativamente aos ecótipos roxos, o que reforça a ideia de que a presença em maior

quantidade desses pigmentos confere cores como amarelo e laranja. Assim, é possível observar que os resultados obtidos neste trabalho experimental estão de acordo com o intervalo observado por estes autores, para os dois pigmentos, e as concentrações destes adequadas a cada ecótipo.

Stintzing et al.^[36], reporta concentrações de betacianinas para o ecótipo laranja de 6,6 mg/L e de betaxantinas 76,3 mg/L. Já para o ecótipo roxo assume concentrações de 431,0 mg/L para as betacianinas e para as betaxantinas de 195,8 mg/L. Estes autores obtiveram para as betacianinas, e para o ecótipo laranja valores superiores comparativamente aos resultados obtidos neste trabalho experimental para os dois extratos, com exceção da casca do extrato metanólico que possui um valor superior. Para as betacianinas do ecótipo roxo e betaxantinas de ambos os ecótipos estes autores reportam valores bastante superiores aos observados. Já Hassan et al.^[25] obtiveram concentrações inferiores para o ecótipo amarelo/laranja, comparativamente aos obtidos no presente trabalho (polpa: 7,55 mg/100g para as betacianinas, e 2,09 mg/100g para as betaxantinas). Fernández-López et al.^[42], também obtiveram concentrações inferiores de betaxantinas e betacianinas, para o ecótipo vermelho (fruto completo: 15,2 mg/100g para as betacianinas, e 25,4 mg/100g para as betaxantinas).

Estes resultados, reforçam a possível utilização deste fruto, como fonte de pigmentos hidrossolúveis naturais, na indústria alimentar^[42], apesar das diferentes concentrações que podem ser encontradas, e que podem ser explicadas em parte às diferentes variedades utilizadas, estado de maturação, às condições edafo-climáticas e/ou práticas culturais ^[29].

4.3 Identificação de compostos bioativos presentes no fruto *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill, por HPLC-MS

4.3.1 Extração SSDM (sea sand disruption method)

A extração de compostos fenólicos a partir de plantas, tem sido tradicionalmente realizada, utilizando extração por solventes, ou técnicas de destilação. Os métodos tradicionais de extração são intensivos, consomem muito tempo, e requerem grandes volumes de solventes. Devido ao rápido desenvolvimento de técnicas analíticas, tem-se

observado no processo extrativo uma diminuição do consumo de solventes, tempo de extração mais rápido, e um aumento da quantificação dos compostos.^[31]

O método de dispersão de matriz em fase sólida (MSPD), é um processo patenteado, que conduz à simultânea disrupção e extração de amostras sólidas e semi-sólidas. Este processo permite um completo fracionamento dos componentes da matriz, assim como origina material que possui características cromatográficas únicas, para a extração de compostos de uma dada amostra. Este método tem sido utilizado no isolamento de drogas em tecidos animais e também na análise de herbicidas, pesticidas, e poluentes em frutos, vegetais e outras matrizes.^[44]

Este processo começa pela disrupção da estrutura em bruto da amostra, de modo a dividi-la em pequenas peças, providenciando uma melhor superfície de contacto, e consequente extração dos compostos. Esta disrupção pode ser realizada, num almofariz de vidro que contenha a amostra, com o auxílio de um suporte sólido, tal como a sílica, que possui grupos quimicamente ligados à sua superfície, grupos esses que podem ser polares ou, tal como o composto octadecylsilyl (C₁₈), apolares, dando origem a uma fase estacionária quimicamente ligada. Este material é também utilizado nas colunas de extração em fase sólida. Assim, este material além de servir como elemento abrasivo, também confere outra dimensão ao processo, pois os componentes da amostra dissolvem e dispersão na fase estacionária, distribuindo-se também por esta, mediante o seu grau de polaridade.^[44]

Até agora, poucos estudos foram publicados, utilizando a técnica MSPD para a extração de compostos fenólicos, e em apenas algumas famílias de plantas foram extraídos compostos fenólicos utilizando a técnica MSPD, tendo sido extraídos compostos como os ácidos fenólicos, isoflavonóides, xantonas e as flavonas.^[31]

Teixeira et al.^[31], reporta que o rendimento da extração em fase líquida, de diversos compostos fenólicos de diferentes famílias, como ácidos fenólicos, flavonóis, e cumarinas, provenientes de folhas de *Ficus carica*, é maior quando utilizado o método de disrupção com areia do mar (SSDM), em que o processo de extração envolve areia do mar, quando comparado com o método MSPD. Além disso, estes autores verificaram que o tempo de preparação e a quantidade de solventes, é menor.

Todos os estudos implicam a utilização de suportes sólidos de sílica no método MSPD,^[44] e assim sendo, o método SSDM demonstra ser um bom substituto devido ao

baixo custo da areia do mar e do método em si, revelando ser também um procedimento extrativo promissor. Neste procedimento experimental, foi utilizado o método SSDM, que embora baseado no método MSPD, tem demonstrado maior rentabilidade e menos custos.^[31]

Foram também utilizadas duas misturas de solventes diferentes, no processo extrativo, nomeadamente, uma mistura trifásica composto por clorofórmio:metanol:água (65:10:1, v/v), que revelou ser o solvente mais adequado para a extração de compostos fenólicos, pois estes compostos possuem uma polaridade diferenciada, entre si. O solvente da mistura trifásica foi o primeiro a ser utilizado, de modo a haver um aumento de polaridade entre solventes. O outro solvente é uma mistura composta por metanol:água (8:2, v/v), e devido ao seu carácter mais polar demonstrou ser mais adequado para a extração de betalaínas, devido ao carácter polar destas, e consequente hidrossolubilidade.

4.3.2 Análise por HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS

Vários estudos publicados, referem a separação e identificação de compostos fenólicos,^{[45] [46] [47] [48] [49]} e pigmentos^{[16] [17] [36] [50] [51]}, na planta *Opuntia ficus-indica*, por HPLC-MS. A utilização da espectrometria de massa (MS), acoplada a HPLC/DAD, em que se utiliza um detetor *Diode Array* (DAD), permite uma identificação imediata dos componentes de uma mistura, e a caracterização de um extrato em relação à sua composição química. A espectrometria de massa fornece o peso molecular e informação estrutural das bandas cromatográficas, que são característicos de um determinado composto, sendo considerada uma técnica sensível e seletiva.^[17] Neste trabalho experimental, foram identificados vários compostos fenólicos e pigmentos, nas amostras dos ecótipos laranja e roxo, por LC-DAD e LC-MS, estando estes representados nas Tabelas 10 e 11, e representados por ordem de eluição, tendo em conta o ecótipo, a parte do fruto (casca e polpa) e o tipo de extração, uma vez que existem diferenças entre ambos. Estes foram caracterizados e identificados, tendo por base os seus tempos de retenção (DAD), espectro UV, ião molecular ($[M+H]^+m/z$) e as respetivas fragmentações, caso existam. A identificação baseou-se, fundamentalmente nos dados obtidos por espectrometria de massa (MS), tendo sido identificado o ião molecular ($[M+H]^+m/z$), dos picos correspondentes aos compostos nos cromatogramas.

Os compostos obtidos foram divididos em quatro famílias, nomeadamente, compostos fenólicos, quercetina-*O*-glicosídeos, isoramnetina-*O*-glicosídeos e betalainas.

4.3.2.1 Compostos fenólicos

Os ácidos fenólicos, do tipo benzóico ou cinâmico, são comumente encontrados como derivados em extratos de plantas, e como grupos acilo agregados a glicosídeos flavonóides. Em algumas situações, as características da sua absorção são análogas à contribuição do anel B no espectro das flavonas e flavonois.^[52] O espectro de absorção das flavonas e flavonois, exhibe tipicamente duas bandas, a banda I, entre os 320-385 nm e a banda II, entre os 250-285 nm.^[53] Quando o padrão de substituição é simétrica no ácido benzóico e em alguns ácidos cinâmicos, o espectro dos ácidos fenólicos, é composto por apenas uma banda de absorção.^[52]

Os compostos correspondentes aos picos 1 e 2 foram extraídos com a mistura trifásica de clorofórmio:metanol:água (65:10:1, v/v), estando os cromatogramas representados na Figura 4.7. Para estes picos foram obtidos, no modo ião negativo, as iões moleculares com m/z 239,02 e 192,87, para os picos 1 e 2, respetivamente. O pico 1, demonstrou um tempo de retenção (DAD) de 34,59 min, e picos de absorção máxima de 232,28 e 323 nm, tendo sido identificado como ácido eucómico, que consiste num ácido hidroxibenzóico^[48], que possui propriedades antioxidantes, e pode ser utilizado no tratamento de desordens da pele relacionadas com o envelhecimento.^[45] A presença deste ácido no fruto e cladódios, foi reportado por Chougui, et al.,^[48] e por Astello-García, et al.^[45], respetivamente.

O pico 2 demonstrou um tempo de retenção de 37,48 min, ião molecular com m/z de 192,87, e picos de absorção máxima de 241, 296sh, 323 nm, tendo sido identificado como ácido ferúlico, que consiste num ácido hidrocínâmico,^[47] uma vez que apresenta um espectro UV muito semelhante ao descrito por Campos et al.^[54]. A presença deste ácido, tem sido reportado no fruto *Opuntia ficus-indica* por Cho et al.^[47], e em cladódios por Guevara-Figueroa et al.^[46], respetivamente. Este composto tem também reportado uma capacidade de inibição da peroxidação lipídica^[48], propriedades anti-inflamatórias, anti-diabéticas, e neuroprotetoras, e tem revelado ser um potente antioxidante^[46] e antiradicalar^[48], que previne danos celulares provocados por radiação UV,^[46]

nomeadamente o envelhecimento^[47]. A presença destes ácidos fenólicos, apenas se verificou na casca do ecótipo laranja, no modo ião negativo.

O composto correspondente ao pico 3, foi extraído com a mistura trifásica de clorofórmio:metanol:água (65:10:1, v/v), estando o cromatograma representado na Figura 4.8. Este pico apresenta um tempo de retenção de 36,18 min, picos de absorção máxima de 300sh e 325 nm, um ião molecular com m/z de 356,8, e um fragmento m/z de 194,89 que pode resultar da perda de uma molécula de glucose $[(M+H)-162]^+$ a partir do ião de massa molecular. Este pico foi identificado como feruloil glucose e revela propriedades antioxidantes^[55]. A sua presença no fruto *Opuntia ficus-indica*, é reportada por Chougui et al.^[48]. Este composto foi apenas detetado e identificado na polpa do ecótipo roxo, no modo ião positivo.

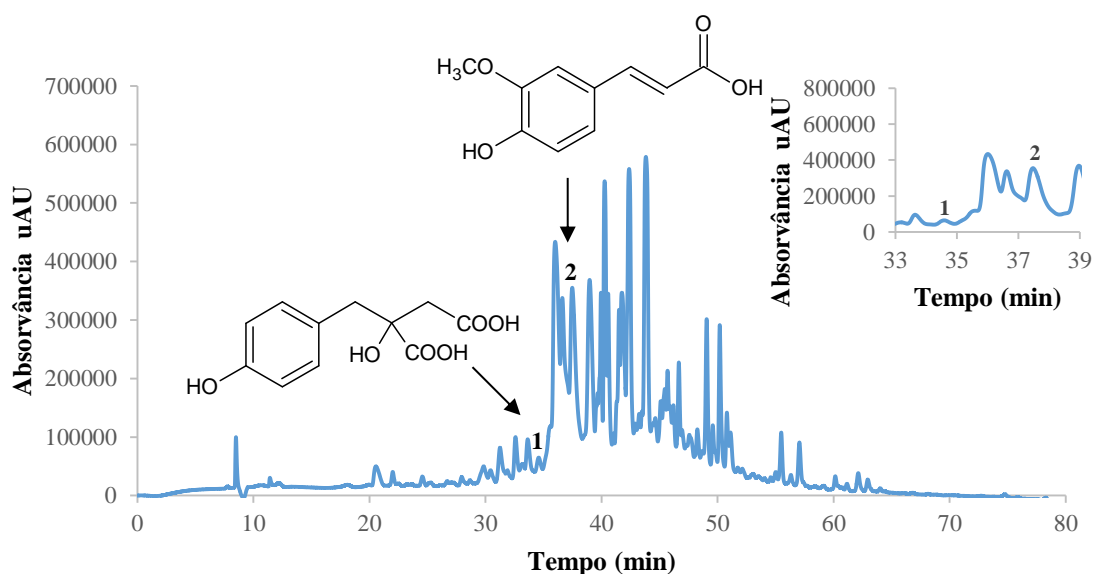


Figura 4.7 – Cromatograma LC-DAD da casca do ecótipo laranja, em modo negativo, e extraída com a mistura trifásica de clorofórmio:metanol:água (65:10:1, v/v).

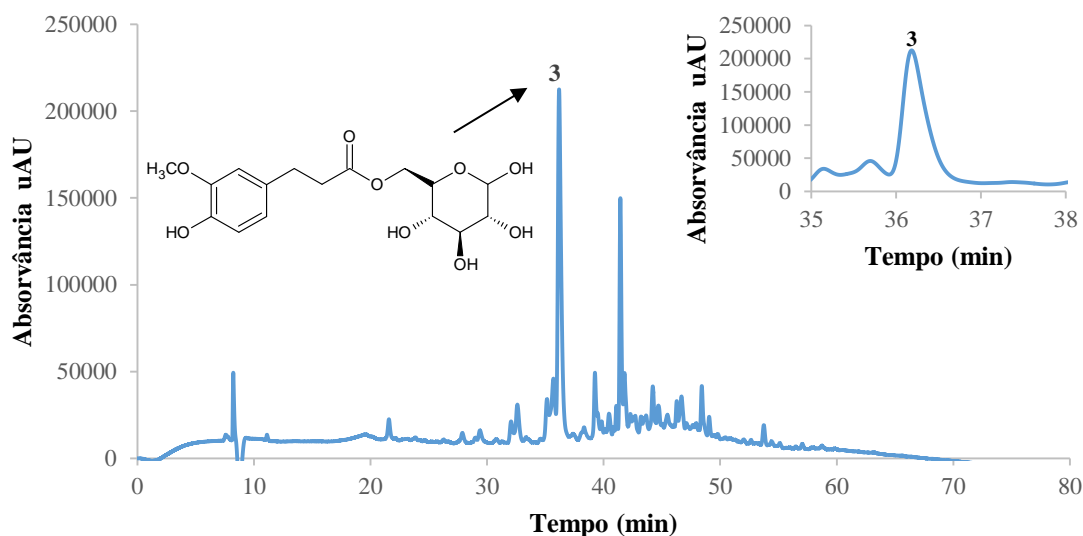


Figura 4.8 – Cromatograma LC-DAD da polpa do ecótipo roxo, em modo positivo, e extraída com a mistura trifásica de clorofórmio:metanol:água (65:10:1, v/v).

4.3.2.2 Quercetina-*O*-glicosídeos

Este grupo de compostos engloba aqueles que possuem açúcares, como por exemplo as hexoses, rarnose e glucose, agregados à aglicona quercetina, cuja estrutura se encontra representada na Figura 2.5. O flavonóide quercetina é um composto antioxidante encontrado muitas vezes nos alimentos na forma glicosilada, e é insolúvel em água. A natureza da glicosilação é conhecida por influenciar a eficiência da sua absorção, sendo a quercetina-3-rutinosídeo, também conhecida por quercetina-3-rarnnosídeo-glicosídeo, uma das formas importantes da quercetina, embora possui menos biodisponibilidade, quando comparada com a quercetina-3-glicosídeo. De qualquer maneira, a quercetina é mais rapidamente absorvida, quando glicosilada. Além disso, este flavonóide tem demonstrado efeitos na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares, cancro, e insuficiência renal e hepática. ^[56]

Os compostos correspondentes aos picos 5 e 6, foram extraídos pela mistura trifásica de clorofórmio:metanol:água (65:10:1, v/v), estando representados nos cromatogramas das Figuras 4.9, para a casca do ecótipo laranja, e 4.10 para a casca do ecótipo roxo. Para a casca do ecótipo laranja foi obtido o pico 5, com um ião molecular com m/z , no modo ião positivo de 756,66, um tempo de retenção de 40,32 min, e picos de absorção máxima de 252, 268, 300sh, e 350 nm. Para a casca do ecótipo roxo também foi obtido o pico 5, com um ião molecular com m/z , no modo ião positivo de 756,66, um

tempo de retenção de 40,33 min, e picos de absorção máxima de 252, 268, 300sh, e 351 nm. Embora não se tenham observado fragmentos, o pico 5 foi identificado como Quercetina-3-*O*-rutinosídeo-ramnosídeo, uma vez que sugere a presença de duas ramnoses e uma glucose agregadas aos flavonóide quercetina [(303+H)+(162+146)]⁺. A sua presença em cladódios da planta *Opuntia-ficus-indica*, foi reportado por Astello-Garcia et al.^[45], e Guevara-Figueroa et al.^[46].

Para a casca do ecótipo laranja, foi obtido o pico 6, com um ião molecular com *m/z*, no modo ião positivo, de 610,63, um tempo de retenção de 42,42 min, picos de absorção máxima de 252, 268sh, 300sh, e 351 nm, e o fragmento com *m/z* de 303,06, que deve consistir no ião de massa molecular do flavonóide quercetina, devido à perda das moléculas ramnose e glucose [(M+H)-(162+146)]⁺. Relativamente à casca do ecótipo roxo, também se verificou o pico 6, com um ião molecular com *m/z* de 610,63, um tempo de retenção de 42,37 min, picos de absorção máxima de 258, 268sh, 300sh, e 352 nm, e o mesmo fragmento com *m/z* de 303,02. Este pico foi identificado como rutina, também conhecida por quercetina-3-*O*-rutinosídeo, tendo sido confirmada com um padrão de rutina. Para o padrão verificou-se um ião molecular com *m/z*, no modo ião positivo, de 610,76, um tempo de retenção de 42,42 min, picos de absorção máxima de 258, 268sh, 300sh, e 352 nm, e os fragmentos com *m/z* de 303,05 e 464,85. O fragmento com *m/z* de 303,05 corresponde ao flavonóide quercetina [(M+H)-(162+146)]⁺, e o fragmento com *m/z* de 464,85, resulta da perda de uma molécula de ramnose [(M+H)-146]⁺. A presença deste composto, foi reportada em cladódios, da planta *Opuntia ficus-indica*, por Guevara-Figueroa et al.^[46], e em frutos por Dhaouadi et al.^[57]. Nos derivados de quercetina as cascas dos dois ecótipos destacam-se perante as polpas, uma vez, que nestas não foram identificados quaisquer outros compostos fenólicos.

4.3.2.3 Isoramnetina-*O*-glicosídeos

Este grupo de compostos engloba aqueles que possuem açúcares, como por exemplo as hexoses, ramnose e glucose, agregados à aglicona isoramnetina, cuja estrutura se encontra representada na Figura 2.5. Este flavonoide tem exibido uma potente ação antioxidante, que resulta num forte efeito protetor contra a peroxidação lipídica provocada pelo H₂O₂^[48], e uma ação neuroprotetora^[46]. Os derivados de isoramnetina têm sido descritos em quantidades muito inferiores na polpa, comparativamente à casca^[48],

sendo o que se verifica neste trabalho experimental, uma vez que, apenas se observaram estes compostos nas cascas dos dois ecótipos.

Os compostos correspondentes aos picos 4 e 7, foram extraídos pela mistura trifásica de clorofórmio:metanol:água (65:10:1, v/v), estando representados nos cromatogramas das Figuras 4.9, para a casca do ecótipo laranja, e 4.10, para a casca do ecótipo roxo. Para a casca do ecótipo laranja foi obtido o pico 4 (Figura 4.9), com um íão molecular com m/z , no modo íão positivo, de 770,70, um tempo de retenção de 40,00 min, picos de absorção máxima de 252, 268, 300sh, e 352 nm, e um fragmento com m/z de 317, cuja existência pode resultar da perda de três moléculas, duas ramnose e uma glucose, resultando no flavonóide isoramnetina com m/z de 317 [(M+H)-(162+146)]⁺. Para a casca do ecótipo roxo, foi também obtido o pico 4 (Figura 4.10), com um íão molecular com m/z , no modo íão positivo de 770,62, um tempo de retenção de 40,04 min, picos de absorção máxima de 253, 268, 300sh, e 352 nm, e o mesmo fragmento com m/z de 317. O pico 4 foi identificado como isoramnetina-3-*O*-ramnosídeo-7-*O*-rutinosídeo, e a sua presença em cladódios da planta *Opuntia-ficus-indica*, foi reportado por Astello-Garcia et al.^[45], e no fruto por Chougui et al.^[48].

Para a casca do ecótipo laranja, foi obtido o pico 7 (Figura 4.9), com um íão molecular com m/z , no modo íão positivo, de 624,70, um tempo de retenção de 43,86 min, picos de absorção máxima de 252, 268sh, 300sh, e 352 nm, e fragmentos com m/z de 317 e 479. Estes fragmentos podem resultar da perda de uma molécula de ramnose (479) [(M+H)-146]⁺, e de uma molécula de ramnose e glucose, que resulta no flavonóide isoramnetina com m/z de 317 [(M+H)-(162+146)]⁺. Relativamente à casca do ecótipo roxo, verificou-se também o pico 7 (Figura 4.10), com um íão molecular com m/z de 624,70, um tempo de retenção de 44,00 min, e picos de absorção máxima de 256, 268sh, 300sh, e 353 nm, e os mesmos fragmentos com m/z de 317 e 479. Este pico foi identificado como Isoramnetina-3-*O*-rutinosídeo, uma vez que apresenta um espectro UV muito semelhante ao descrito por Campos et al.^[58]. A presença deste composto em cladódios da planta *Opuntia-ficus-indica*, foi reportado por Astello-Garcia et al.^[45], e Guevara-Figueroa et al.^[46], e no fruto por Chougui et al.^[48]. Nos derivados de isoramnetina as cascas dos dois ecótipos destacam-se perante as polpas, uma vez, que nestas não foram identificados quaisquer outros compostos fenólicos.

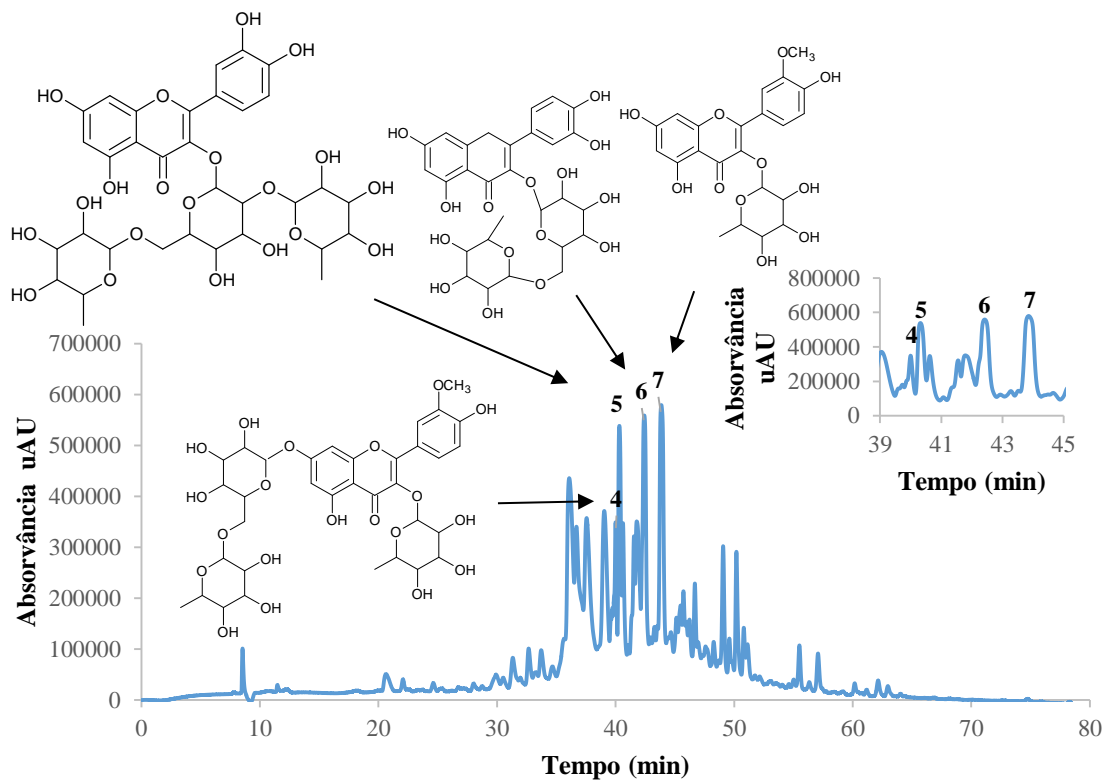


Figura 4.9 – Cromatograma LC-DAD da casca do ecótipo laranja, em modo positivo, e extraída com a mistura trifásica de clorofórmio:metanol:água (65:10:1, v/v).

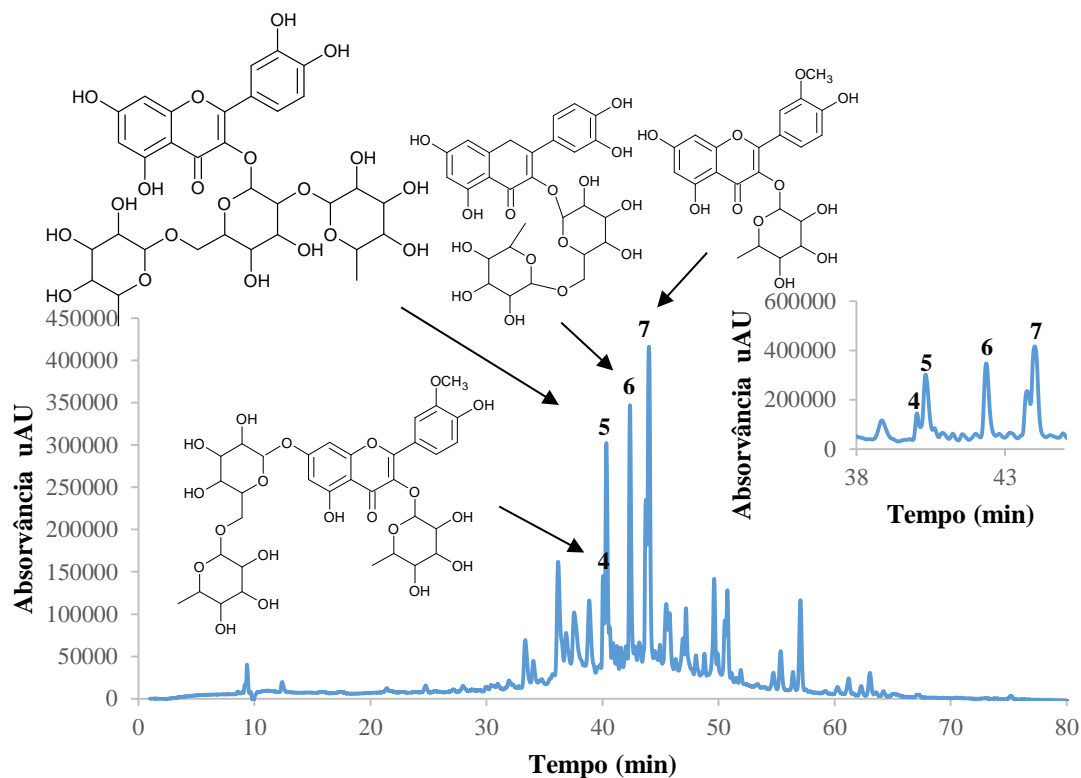


Figura 4.10 – Cromatograma LC-DAD da casca do ecótipo roxo, em modo positivo, e extraída com a mistura trifásica de clorofórmio:metanol:água (65:10:1, v/v).

4.3.2.4 Betalaínas

A este grupo de compostos, pertencem os pigmentos betalaínas, cujo interesse tem aumentado recentemente, devido ao seu potencial efeito antioxidante, que lhe confere maior valor comercial, devido, à utilização de antioxidantes na indústria alimentar, não só como conservantes, como também, devido aos seus efeitos benéficos para a saúde humana. Na investigação destes pigmentos, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), tem-se tornado a técnica de eleição para a separação, rápida quantificação e identificação destes.^[17]

Os compostos correspondentes aos picos 8, 9 e 10, foram extraídos pela mistura metanol:água (8:2, v/v), estando representados nos cromatogramas das Figuras 4.11, 4.12, e 4.13, para a casca do ecótipo laranja, casca do ecótipo roxo e polpa do ecótipo roxo, respetivamente. Para a casca do ecótipo laranja foram obtidos os picos 8 e 10 (Figura 4.11), sendo que, o pico 8 apresentou um ião molecular com m/z , no modo ião positivo, de 550,95, um tempo de retenção de 26,68 min, um pico de absorção máxima de 529 nm, e um fragmento com m/z de 389. Este pico foi identificado como sendo o composto betanina, que pertence à família das betacianinas, devido ao seu ião molecular, pico de absorção máxima, e o fragmento característico das betacianinas, que corresponde à aglicona protonada (betanina + H⁺, ou isobetanina + H⁺).^{[16] [51]} A presença deste composto no fruto da planta *Opuntia-ficus-indica*, foi reportado por Stintzing et al.^{[36] [50]}, Cejudo-Bastante et al.^[16], e Fernández-López et al.^{[17] [51]}. Já o pico 10, demonstrou um ião molecular com m/z , no modo ião positivo, de 309,06, um tempo de retenção de 27,41 min, um pico de absorção máxima de 472 nm, e um fragmento com m/z de 263. Este pico foi identificado como sendo o composto indicaxantina, pertencente à família das betaxantinas, devido ao seu ião molecular, pico de absorção máximo e fragmento, que corresponde ao ião filho.^[16] A presença deste composto no fruto da planta *Opuntia-ficus-indica*, foi reportado por Stintzing et al.^{[36] [50]}, Cejudo-Bastante et al.^[16], e Fernández-López et al.^[17]. Estes compostos não foram identificados para a polpa do ecótipo laranja.

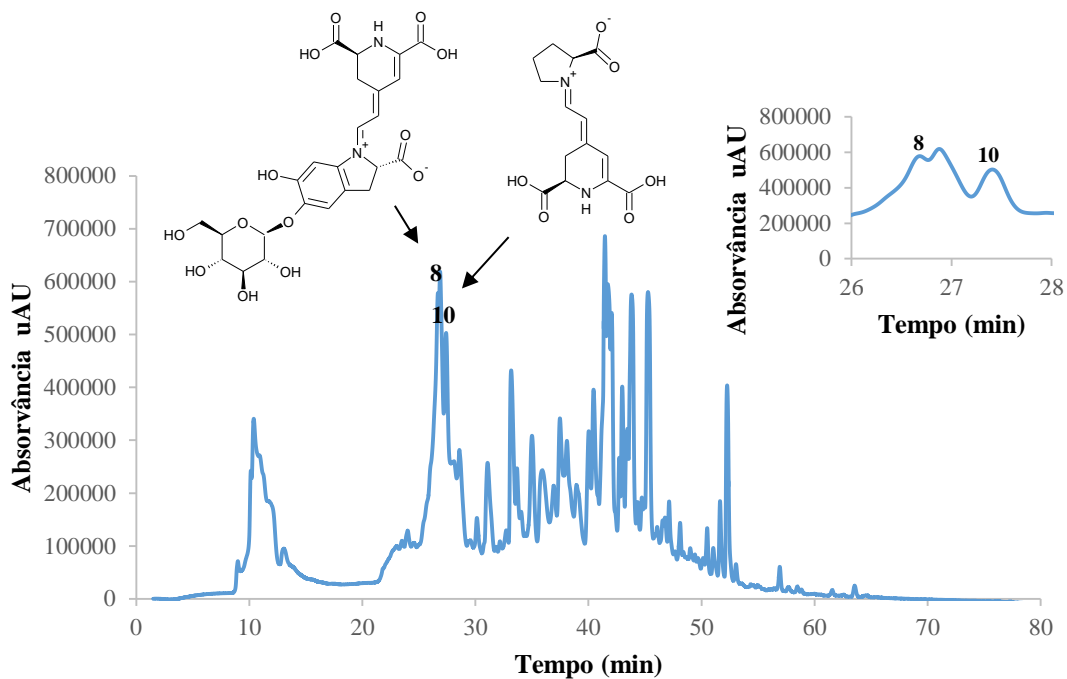


Figura 4.11 – Cromatograma LC-DAD da casca do ecótipo laranja, em modo positivo, e extraída com a mistura metanol:água (8:2, v/v).

Para a casca do ecótipo roxo foi obtido o pico 8 (Figura 4.12), sendo que, o pico 8 apresentou um ião molecular com m/z , no modo ião positivo, de 550,99, um tempo de retenção de 26,20 min, um pico de absorção máxima de 537 nm, e um fragmento m/z de 389. Para a polpa do ecótipo roxo, o pico 8 (Figura 4.13) apresentou um ião molecular m/z , no modo ião positivo, de 550,96, um tempo de retenção de 26,20 min, um pico de absorção máxima de 537 nm, e um fragmento com m/z de 389. Este pico foi identificado como sendo o composto betanina, que pertence à família das betacianinas, devido ao seu ião molecular, pico de absorção máxima, e o fragmento característico das betacianinas, que corresponde à aglicona protonada (betanina + H^+ , ou isobetanina + H^+).^{[11] [57]} A presença deste composto no fruto da planta *Opuntia-ficus-indica*, foi reportado por Stintzing et al.^{[36] [50]}, Cejudo-Bastante et al.^[16], e Fernández-López et al.^{[17] [51]}. O pico 9 foi apenas identificado na polpa e casca do ecótipo roxo, e para a casca deste o pico 9 (Figura 4.12) apresentou um ião molecular com m/z de 551, no modo ião positivo, um tempo de retenção de 27,24 min, um pico de absorção máxima de 532 nm, e o fragmento m/z característico das betacianinas 389. Para a polpa do ecótipo roxo o pico 9 (Figura 4.13) demonstrou um ião molecular com m/z de 551, no modo ião positivo, um tempo de retenção de 27,22 min, um pico de absorção máxima de 533 nm, e mais uma vez, o fragmento com m/z característico das betacianinas 389. O composto correspondente ao

pico 9, foi identificado como isobetanina, que apesar de possuir o mesmo íão molecular, e um pico de absorção máximo praticamente igual ao da betanina, o seu tempo de retenção é superior, uma vez que surge sempre depois desta. A presença deste composto no fruto da planta *Opuntia-ficus-indica*, foi reportado por Stintzing et al.^[36]^[50], Cejudo-Bastante et al.^[16], e Fernández-López et al.^[50]^[51].

Já pico o 10, foi observado também para a casca e polpa do ecótipo roxo, sendo que para a casca deste (Figura 4.12), demonstrou um íão molecular com m/z , no modo íão positivo, de 309,03, um tempo de retenção de 27,78 min, um pico de absorção máxima de 475 nm, e um fragmento com m/z de 263. Para a polpa do ecótipo roxo, o pico 10 (Figura 4.13), demonstrou um íão molecular m/z , no modo íão positivo, de 309,03, um tempo de retenção de 27,77 min, um pico de absorção máxima de 473 nm, e um fragmento com m/z de 263. Este pico foi identificado como sendo o composto indicaxantina, pertencente à família das betaxantinas, devido ao seu íão molecular, pico de absorção máximo e fragmento, que corresponde ao íão filho.^[16] A presença deste composto no fruto da planta *Opuntia-ficus-indica*, foi reportado por Stintzing et al.^[36]^[50], Cejudo-Bastante et al.^[16], e Fernández-López et al.^[17]. Na identificação de betalafinas destaca-se o ecótipo roxo, uma vez que foram identificados compostos na casca e na polpa, sendo que, no ecótipo laranja apenas foram identificados compostos na casca.

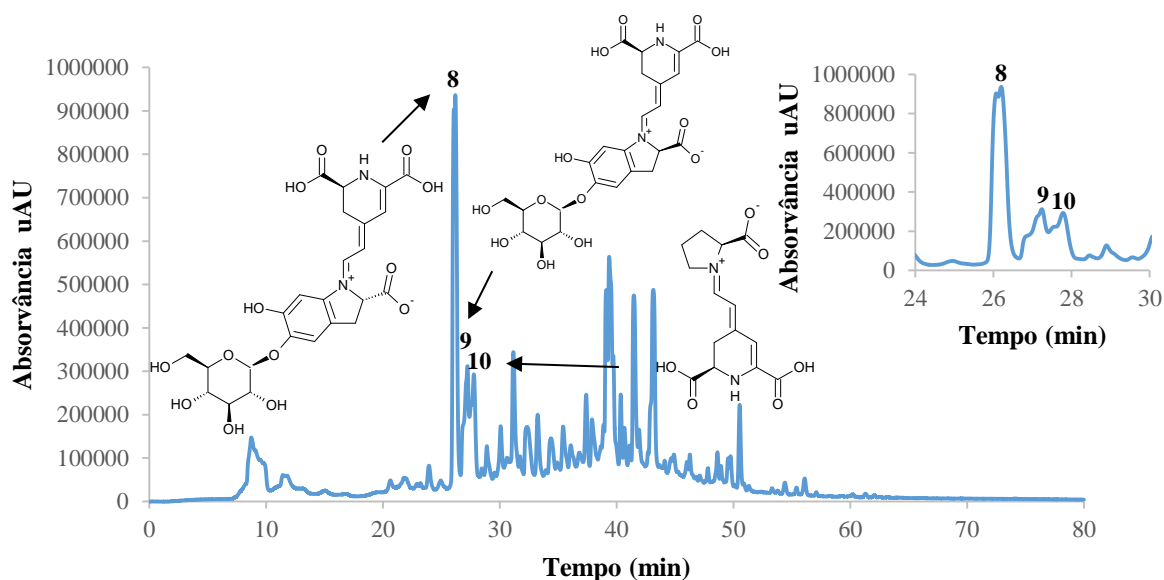


Figura 4.12 – Cromatograma LC-DAD da casca do ecótipo roxo, em modo positivo, e extraída com a mistura metanol:água (8:2, v/v).

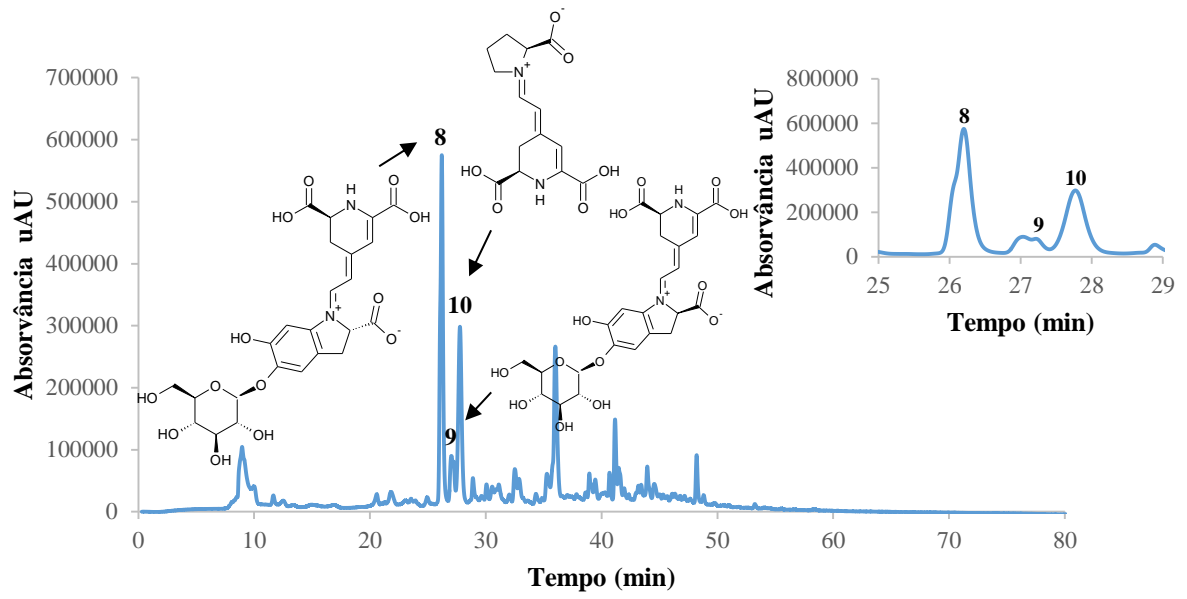


Figura 4.13 – Cromatograma LC-DAD da polpa do ecótipo roxo, em modo positivo, e extraída com a mistura metanol:água (8:2, v/v).

Quadro 10 – Identificação de compostos nos extratos do ecótipo laranja *Opuntia* spp, por HPLC-MS

Pico	Amostra	Solvente extração	Tr (min) DAD	UV máx (nm)	[M-H] ⁺ (m/z)	MS/MS (m/z) fragmentos	Identificação provável	Família
1	Laranja/Casca	Trifásico	34,59	232; 276; 323	239	Não detetado	Ácido eucómico	Ácido fenólico
2	Laranja/Casca	Trifásico	37,48	241; 296sh; 323	193	Não detetado	Ácido ferúlico	Ácido fenólico
4	Laranja/Casca	Trifásico	40,00	252; 268 sh; 300 sh; 350	771	317	Isoramnetina 3-O-ramnosídeo-7-O-rutinosídeo	Flavonóide
5	Laranja/Casca	Trifásico	40,32	252; 268 sh; 300 sh; 350	757	Não detetado	Quercetina 3-O-rutinosídeo-ramnosídeo	Flavonóide
6	Padrão		42,42	258; 268sh; 300sh; 352	611	464,85; 303,05	Rutina	Flavonóide
6	Laranja/Casca	Trifásico	42,42	252; 260sh; 300sh; 351	611	303,06	Rutina	Flavonóide
7	Laranja/Casca	Trifásico	43,86	252; 268 sh; 300 sh; 352	625	317; 479	Isoramnetina-3-O-rutinosídeo	Flavonóide
8	Laranja/Casca	Metanol/Água	26,68	529	551	389	Betanina	Betacianina
10	Laranja/Casca	Metanol/Água	27,41	472	309	263	Indicaxantina	Betaxantina

Os picos que se encontram a amarelo, foram obtidos no modo ião negativo.

Quadro 11 – Identificação de compostos nos extratos do ecótipo roxo *Opuntia* spp, por HPLC-MS

Pico	Amostra	Solvente extração	Tr (min) DAD	UV máx (nm)	[M-H]⁺ (m/z)	MS/MS (m/z) fragmentos	Identificação provável	Família
3	Roxo/Polpa	Trifásico	36,18	300sh; 325	357	194,89	Feruloyl glucose	Flavonóide
4	Roxo/Casca	Trifásico	40,04	253; 268sh; 300sh; 352	771	317	Isoramnetina 3-O-ramnosídeo-7-O-rutinosídeo	Flavonóide
5	Roxo/Casca	Trifásico	40,33	252; 268sh; 300sh; 351	757	Não detetado	Quercetina 3-O-rutisídeo-ramnosídeo	Flavonóide
6	Roxo/Casca	Trifásico	42,37	258; 268sh; 300sh; 352	611	303,02	Rutina	Flavonóide
7	Roxo/Casca	Trifásico	44,00	256; 268sh; 300sh; 353	625	317; 479	Isoramnetina-3-O-rutinosídeo	Flavonóide
8	Roxo/Casca	Metanol/Água	26,20	537	551	389	Betanina	Betacianina
9	Roxo/Casca	Metanol/Água	27,24	532	551	389	Isobetanina	Betacianina
10	Roxo/Casca	Metanol/Água	27,78	475	309	263	Indicaxantina	Betaxantina
8	Roxo/Polpa	Metanol/Água	26,20	537	551	389	Betanina	Betacianina
9	Roxo/Polpa	Metanol/Água	27,22	533	551	389	Isobetanina	Betacianina
10	Roxo/Polpa	Metanol/Água	27,77	473	309	263	Indicaxantina	Betaxantina

4.4 Determinação da atividade antioxidante do fruto *Opuntia ficus-indica* (L.)

Mill

4.4.1 Método de captação de radicais ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acide]

O método espectrofotométrico ABTS [2,2'-azinobis-(3ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], é um método adequado para a medição da capacidade antioxidante de substâncias hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos, através da captura do radical catiónico ABTS^{•+}. Este consiste num radical cromóforo azul esverdeado, que resulta da oxidação do composto ABTS com persulfato de potássio. O catião radical tem uma absorção máxima aos comprimentos de onda 645 nm, 734 nm, 815 nm, e ao mais comumente utilizado, 415 nm.^[32]

A adição de agentes antioxidantes ao radical catiónico pré-formado, reduz o composto em ABTS, diminuindo a quantidade do radical catiónico e conseqüentemente, a diminuição da cor azul esverdeado. Essa redução é gerada numa determinada proporção e tempo, dependendo da atividade antioxidante, concentração do agente antioxidante e da duração da reação. A extensão da reação é medida em percentagem de inibição do radical catiónico ABTS^{•+}, e determinada em função da concentração e do tempo. É calculada posteriormente, através de soluções padrão de Trolox, sob as mesmas condições e que por interpolação da reta de calibração, formada a partir dessas soluções, permite apresentar os resultados de atividade antioxidante em μmol equivalente Trolox/g.^[32]

Relativamente aos valores obtidos no presente trabalho, demonstrados no Quadro 12, é possível observar uma grande diferença entre os valores de casca e polpa dentro do mesmo ecótipo e entre ecótipos, e também, entre os extratos aquosos e metanólicos. Para a casca do ecótipo roxo, do extrato metanólico, foram obtidos 19,35 μmol Trolox/g, e para a polpa 6,82 μmol Trolox/g. Para a casca do ecótipo laranja do extrato metanólico, foram obtidos 11,50 μmol Trolox/g, e 3,72 μmol Trolox/g. Para o extrato metanólico é possível observar diferenças bastante significativas entre os valores de casca e polpa, dentro do mesmo ecótipo, notando-se valores superiores para a casca, em ambos os ecótipos. Neste extrato, a atividade no ecótipo roxo é ainda mais elevada, tanto para a casca, como para a polpa, comparativamente ao ecótipo laranja. É de notar também que a polpa do ecótipo roxo e a casca do ecótipo laranja possuem valores significativamente semelhantes entre si.

Em relação à casca do ecótipo roxo, do extrato aquoso, foram obtidos 37,23 μmol Trolox/g, e para a polpa 18,85 μmol Trolox/g. Para a casca do ecótipo laranja, do extrato aquoso, obtiveram-se 19,09 μmol Trolox/g, e para a polpa 3,39 μmol Trolox/g. Verificase, a mesma situação, observada no extrato metanólico, em que a casca apresenta atividades mais elevadas comparativamente à polpa em ambos os ecótipos, e o ecótipo roxo apresenta uma atividade ainda mais elevada, tanto para a casca, como para polpa, demonstrando, por isso ser, o ecótipo com maior atividade antioxidante, principalmente no extrato aquoso. Tal como no extrato metanólico, a polpa do ecótipo roxo e a casca do ecótipo laranja possuem valores significativamente semelhantes entre si.

Quadro 12 – Determinação da atividade antioxidante dos ecótipos roxo e laranja do fruto *Opuntia ficus-indica*

Extrato	Fruto	Parte do fruto	Nº replicados	ABTS [(μmol)Trolox/g]	Molibdato [mg(EAAs)/g]
Metanol	Roxo	Casca	3	19,35±4,78 ^b	4,7±3,2 ^a
		Polpa	3	6,82±2,39 ^{ab}	10,0±11,0 ^a
	Laranja	Casca	3	11,50±0,48 ^{ab}	14,8±11,2 ^a
		Polpa	3	3,72±1,46 ^a	8,7±8,0 ^a
Água	Roxo	Casca	3	37,23±13,62 ^c	54,9±26,5 ^b
		Polpa	3	18,85±5,37 ^b	26,7±17,1 ^{ab}
	Laranja	Casca	3	19,09±3,39 ^b	13,5±2,9 ^a
		Polpa	3	3,39±0,49 ^a	11,1±2,9 ^a

Por coluna, as amostras com a mesma letra, não são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

Comparando ambos os extratos, verifica-se que para o extrato aquoso, a atividade é superior, e assim significativamente diferente entre ecótipos e partes do fruto, à exceção da polpa do ecótipo laranja do extrato aquoso, que possui uma atividade semelhante à polpa do ecótipo laranja do extrato metanólico. Os resultados parecem indicar que a água poderá ser melhor solvente para a extração dos compostos responsáveis pela atividade antioxidante. É de salientar que mesmo a água sendo considerada o melhor solvente, existem valores de atividade significativamente semelhantes entre si, entre extratos, nomeadamente, as polpas do ecótipo roxo do extrato metanólico e do ecótipo laranja do extrato aquoso.

Ao comparar os resultados obtidos com os observados na literatura, verifica-se que para as polpas, à exceção da polpa do ecótipo roxo do extrato aquoso, os valores são

semelhantes pois, segundo Albano et al.^[41], os valores obtidos para a polpa do ecótipo roxo foram 0,61 mmol Trolox/100g, o que equivale a 6,1 $\mu\text{mol Trolox/g}$, e para o ecótipo laranja 0,37 mmol Trolox/100g, o que equivale a 3,7 $\mu\text{mol Trolox/g}$. Segundo Stintzing et al.^[36], os valores obtidos para polpa do ecótipo roxo foram 3,64 mmol Trolox/Kg, que equivale a 3,64 $\mu\text{mol Trolox/g}$, e para a polpa do ecótipo laranja 2,32 mmol Trolox/Kg, o que equivale a 2,32 $\mu\text{mol Trolox/g}$. Neste caso, verifica-se que os valores obtidos neste procedimento experimental, são ligeiramente superiores aos obtidos por estes autores, para a polpa do ecótipo laranja de ambos os extratos e principalmente para a polpa do ecótipo roxo que possui valores muito superiores. Segundo Butera et al.^[43], os valores para três ecótipos diferentes de polpa do fruto, localizam-se entre os 4,36 e 5,31 $\mu\text{mol Trolox/g}$, pelo que se encontram ligeiramente acima do valores observados neste procedimento experimental para a polpa do ecótipo laranja do extrato aquoso e metanólico, mas abaixo do observado para a polpa do ecótipo roxo do extrato metanólico e aquoso. Segundo Fernández-López et al.^[42], os valores obtidos para todo o fruto do ecótipo vermelho foram de 6,70 $\mu\text{mol Trolox/g}$, sendo semelhantes aos observados para a polpa da variedade roxa do extrato metanólico, mas estando acima dos valores obtidos para as polpas do ecótipo laranja de ambos os extratos e abaixo dos restantes valores observados. Para as cascas foram observados valores muito acima daqueles observados na literatura, o que pode significar que a casca possui maior atividade antioxidante, possivelmente devido ao elevado teor de pigmentos existente na casca do fruto.^[42]

4.4.2 Método de redução de Mo(VI) a Mo(V)

O método espectrofotométrico do fosfomolibdénio, baseia-se na quantificação da capacidade antioxidante, através da redução de Mo(VI) para Mo(V), pela amostra a analisar e a subsequente formação do complexo verde fosfato/Mo(V), em pH ácido. A solução inicial possui uma cor amarelada e à medida que a reação de redução ocorre, esta vai-se tornando verde escura. Devido à sua simplicidade e reagentes baratos, revela ser uma boa alternativa a outros métodos disponíveis que também avaliam a capacidade antioxidante.^[33]

Relativamente aos resultados obtidos, representados no Quadro 12, é possível observar que, mais uma vez a casca destaca-se relativamente à polpa, uma vez que apresenta atividades mais elevadas, à exceção da polpa do ecótipo roxo do extrato

metanólico, possivelmente devido a algum erro durante o procedimento experimental. Para a casca do ecótipo roxo do extrato metanólico, obteve-se 4,7 mg equivalente de ácido ascórbico (EAAs)/g, e para a polpa 10,0 mg (EAAs)/g. Para a casca do ecótipos laranja do extrato metanólico obteve-se 14,8 mg (EAAs)/g, e para a polpa 8,7 mg (EAAs)/g. Assim, dentro do extrato metanólico, é possível observar uma semelhança nas atividades das cascas e das polpas, dentro do mesmo ecótipo e entre ecótipos, embora, contrariamente ao que se tem observado, observam-se atividades mais elevadas para a casca do ecótipo laranja e para a polpa do ecótipo roxo.

Relativamente ao extrato aquoso, nomeadamente para a casca do ecótipo roxo foi obtida uma atividade de 54,9 mg (EAAs)/g, e para a polpa 26,7 mg (EAAs)/g. Para a casca do ecótipo laranja foi obtida uma atividade de 13,5 mg (EAAs)/g, e para a polpa 11,1 mg (EAAs)/g. Assim, no extrato aquoso, observam-se diferenças significativas entre ecótipos, e uma atividade mais elevada para o ecótipo roxo.

Comparando ambos os extratos, verifica-se que o extrato aquoso apresenta atividades mais elevadas, tal como se verifica no método ABTS, com exceção da polpa do ecótipo laranja, o que reforça a ideia de que a utilização de água como solvente parece ser mais eficaz no processo extrativo de compostos bioativos. Além disso, observa-se que os valores são praticamente todos significativamente semelhantes entre si, com exceção do ecótipo roxo do extrato aquoso que apresenta concentrações superiores para casca e polpa e por isso significativamente diferentes, dos restantes. O ecótipo roxo demonstra então ser, o ecótipo com maior atividade antioxidante, principalmente nos extratos aquosos.

Ambos os métodos mostram que, o fruto dos dois ecótipos, têm atividade antioxidante, particularmente os extratos aquosos do ecótipo roxo, o que pode significar que este ecótipo é uma boa fonte de agentes antioxidantes, particularmente a casca.

4.5 Capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase pelo fruto *Opuntia Ficus-indica* (L.) Mill

Estudos sugerem que os processos oxidativos podem estar envolvidos na etiologia da doença de Alzheimer (AD). A acumulação de danos nas membranas plasmáticas e no ADN, provenientes de espécies reativas de oxigénio levam à disrupção do funcionamento

normal da célula e conseqüentemente à morte neuronal. Nutrientes antioxidantes, incluindo vitamina E, vitamina C e β -carotenos, estão entre os mecanismos de defesa naturais contra o stress oxidativo. Estes compostos também têm demonstrado, em estudos de laboratório e em animais, através da análise de tecido cerebral, um decréscimo na peroxidação lipídica e oxidação de proteínas, inibição da produção de espécies reativas de oxigênio, prevenção da disfunção mitocondrial e fragmentação de ADN, redução da neurotoxicidade e apoptose e morte neuronal.^[59] Segundo Mata et al. plantas utilizadas como ervas aromáticas tais como o funcho, menta, alecrim, poejo e tomilho selvagem, demonstraram moderada atividade anticolinesterase, destacando-se o óleo essencial de alecrim como o mais ativo.^[33]

A doença de Alzheimer é a causa mais comum de demência,^[33] que embora possa ocorrer em idades jovens por enfermidades cerebrais variadas, está ligada ao fenómeno de envelhecimento cerebral, acometendo indivíduos com idade superior a 65 anos. Os sintomas da doença estão associados ao declínio cognitivo e deterioração mental, e resultam da perda progressiva e massiva de neurónios de diferentes partes do cérebro. A doença está associada a défices de diversos neurotransmissores cerebrais tais como a acetilcolina, noradrenalina e a serotonina. O seu tratamento sintomático é apenas sintomático e envolve maioritariamente a restauração da função colinérgica. Esta restauração passa por um aumento dos níveis de acetilcolina, de modo a melhorar um dos sinais da doença, a dificuldade de aprendizagem.^[60] A acetilcolina está envolvida na transferência de sinal durante as sinapses, e após exercer a sua função é usualmente hidrolisada, originando colina e acetato, numa reação catalisada pela enzima acetilcolinesterase.^[33]

O mecanismo de ação dos fármacos inibidores da enzima acetilcolinesterase, tais como tacrina, rivastigmina, donezepilo e galantamina,^[61] baseiam-se na ação inibitória da enzima acetilcolinesterase que, por sua vez, está associada à superfície da membrana extracelular e desempenha um papel importante na proteção das células cerebrais.^[33] Estes fármacos têm demonstrado, até agora, a maior eficiência no tratamento clínico na doença de Alzheimer.^[60]

A utilização de extratos de plantas, em terapia para doenças do cérebro, com propriedades farmacológicas relacionadas com o aumento de memória e aprendizagem, não são investigadas na medicina ocidental, com exceção dos gincolídeos. Assim é

necessário incentivar a pesquisa de plantas medicinais específicas, que aumentem os níveis da acetilcolina, de modo a melhorar os sinais de deficiência de aprendizagem a custos relativamente baixos.^[60]

Os resultados obtidos neste trabalho experimental, representados no Quadro 13, apresentam percentagens de inibição superiores para a casca comparativamente às polpas, nos ecótipos laranja e roxo, e no extrato aquoso e metanólico, com concentrações de 1 g/10mL e 1 g/5mL, respetivamente. Para as polpas dos dois extratos e ecótipos, não se verifica qualquer atividade inibitória, com exceção da polpa do ecótipo laranja do extrato aquoso, que possui uma atividade inibitória de 18,9%, significativamente semelhante à casca do mesmo extrato e ecótipo, com uma atividade inibitória de 19,2%. A casca do ecótipo laranja do extrato metanólico, demonstrou uma atividade inibitória de 47,1%, tendo sido a mais elevada, quando comparada com a casca do ecótipo roxo do mesmo extrato, de 23,8%, e com a casca do ecótipo roxo do extrato aquoso, de 36,9%. Assim, a casca do ecótipo laranja do extrato metanólico destaca-se como aquela com maior atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase.

Com estes resultados, verifica-se que, a casca do fruto possui uma atividade inibitória significativa da enzima acetilcolinesterase, quando comparada com a polpa, destacando-se o ecótipo laranja. Contudo, é necessário uma pesquisa mais aprofundada, de modo, a descobrir quais os compostos que são efetivamente responsáveis por esta atividade, e de que forma é possível potenciar essa atividade, através do seu isolamento.

Quadro 13 – Determinação da % de inibição da enzima acetilcolinesterase dos ecótipos roxo e laranja do fruto *Opuntia ficus-indica*

Extrato	Fruto	Parte do fruto	Nº replicados	Microplaca (% inibição)
Metanol	Roxo	Casca	2	23,8±3,3 ^b
		Polpa	2	0,0±0,0 ^a
	Laranja	Casca	2	47,1±1,4 ^c
		Polpa	2	0,0±0,0 ^a
Água	Roxo	Casca	2	36,9±7,7 ^c
		Polpa	2	0,0±0,0 ^a
	Laranja	Casca	2	19,2±10,8 ^b
		Polpa	2	18,9±0,3 ^b

As amostras com a mesma letra, não são significativamente diferentes entre si (p < 0,05).

5. Conclusão

O interesse dos investigadores pelas propriedades do fruto *Opuntia ficus-indica*, e o estudo da sua composição química e diferentes atividades, constatou que este possui elevado potencial biológico e nutricional. O presente estudo revela que o fruto, mas particularmente a casca possui atividade antioxidante bem como capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase. Foi o ecotipo roxo que apresentou maior capacidade antioxidante, ao passo que o ecotipo laranja se revelou melhor inibidor da acetilcolinesterase.

Não se pode dizer com os resultados agora apresentados que os frutos podem substituir um antioxidante ou um inibidor da acetilcolinesterase tão bem como os antioxidantes ou os inibidores da acetilcolinesterase de referência agora existentes no mercado. Apenas tenta mostrar que uma planta que cresce bem em zonas semi-áridas, geralmente, em terrenos pobres e de população empobrecida, é uma fonte de compostos bioativos que, juntamente com outros alimentos igualmente saudáveis, pode e deve constituir uma alimentação equilibrada e saudável.

6. Bibliografia

1. Cunha, A. P. & Roque, O. R. (2014). Interesse da Indústria Farmacêutica pelas matérias-primas vegetais. In: Cunha, A. P., et al. (4^o edição), *Farmacognosia e Fitoquímica* (pp. 58-60). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
2. Cunha, A. P. & Roque, O. R. (2014). A Fitoterapia na atualidade. In: Cunha, A. P. et al. (4^o edição), *Plantas e Produtos vegetais em Fitoterapia* (pp. 21-22). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
3. Cunha, A. P. & Roque, O. R. (2014). Obtenção de moléculas com atividade farmacológica a partir de material vegetal e sua transformação em medicamento. In: Cunha, A. P. et al. (4^o edição), *Farmacognosia e Fitoquímica* (pp. 110-111). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
4. Albano, C., Negro, C., Tommasi, N., Gerardi, C., Mita, G., Miceli, A., Bellis, L., & Blando, F. (2015). Betalains, Phenols and antioxidant capacity in cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] Fruits Apulia (South Italy) Genotypes. *Antioxidants*, 4, 269-280. doi:10.3390/antiox4020269
5. Feugang, F. M., Konarski, P., Zou D., Stintzing, F. C., & Zou C. (2006). Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Frontiers in Bioscience*, 11, 2574-2589. doi: 10.2741/1992
6. Alves, M. A., Souza, A. C. M., Rojas, G. G. & Guerra, N. B. (2008). Fruto de Palma [*Opuntia ficus-indica* (L) Miller, Cactaceae]: morfologia, composição química, fisiologia, índices de colheita e fisiologia pós-colheita. *Revista Iberoamericana de Tecnologia Postcosecha*, 9 (1), 16-25.
7. Shedbalkar, U.U., Adki, V.S., Jadhav, J.P., & Bapat, V.A. (2010). Opuntia and other cacti: applications and biotechnological insights. *Tropical Plant Biology*, 3, 136–150. doi:10.1007/s12042-010-9055-0
8. Cunha, A. P. & Roque, O. R. (2014). Monografia de plantas e produtos vegetais mais usados em fitoterapia. In: Cunha, A. P. et al. (4^o edição), *Plantas e Produtos vegetais em Fitoterapia* (pp. 329). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
9. Madrigal-Santillán, E., García-Melo, F., Morales-González, J. A., Vázquez-Alvarado, P., Muñoz-Juárez, S., Zuñiga-Perez, C., Sumaya-Martínez, M. T., Madrigal-Bujaidar, E., & Hernández-Ceruelos, A. (2013). Antioxidant and anticlastogenic capacity of prickly pear juice. *Nutrients*, 5, 4145-4158. doi:10.3390/nu5104145
10. Pereira, J. (2014). Frutas Legumes e Flores. Consultado em Maio, 2016 em: <http://www.flfrevista.pt/2014/03/1-o-encontro-nacional-do-figo-da-india/>
11. Malheiro, A (2015). Agronegócios. Consultado em Maio 29, 2016 em: <http://www.agronegocios.eu/noticias/figo-da-india-ganha-terreno-no-pais-e-exportacao-pode-chegar-em-2016/>
12. Anónimo (2014) Lar natural. Consultado em Maio 2016 em: http://mlb-s2-p.mlstatic.com/10-sementes-de-figo-da-india-14040-MLB224189755_836-O.jpg
13. Kossori, R. L., Villaume, C., Boustani, E., Sauvaire, Y., & Méjean, L. (1998). Composition of pulp, skin and seeds of prickly pears fruit (*Opuntia ficus indica* sp.). *Plant Foods for Human Nutrition*, 52, 263-270.
14. Cunha, A. P. & Roque, O. R. (2014). Flavonóides. In: Cunha, A. P. et al. (4^o edição), *Farmacognosia e Fitoquímica* (pp. 238-241). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
15. Kuti, J. O. (2004). Antioxidant compounds from four *Opuntia* cactus pear fruit varieties. *Food Chemistry*, 85, 527-533. doi:10.1016/S0308-8146(03)00184-5

16. Cejudo-Bastante, M. J., Chaalal, M., Louaileche, H., Parrado, J., & Heredia, F. J. (2014). Betalain profile, phenolic content, and color characterization of different parts and varieties of *Opuntia ficus-indica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*, 8491-8499. doi:10.1021/jf502465g
17. Fernández-López, J. A., Castellar, R., Obón, J. M., & Almela, L. (2002). Screening and mass-spectral confirmation of betalains in cactus pears. *Chromatographia*, *56*(9/10), 591-595.
18. Tesoriere, L., Fazzari, M., Angileri, F., Gentile, C., & Livrea, M. A. (2008). In vitro degestion of betalainic foods. Stability and bioaccessibility of betaxanthins and betacyanines and antioxidative potencial of food digesta. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 10487-10492. doi:10.1021/jf8017172
19. Zou, D., Brewer, M., Garcia, F., Feugang, J. M., Wang, J., Zang, R., Liu, H., Zou, C. (2005). Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. *Nutrition Journal*, *4*, 25. doi:10.1186/1475-2891-4-25
20. Shedbalkar, U. U., Adki, V. S., Jadhav, J. P., & Bapat, V. A. (2010). *Opuntia* and other cacti: applications and biotechnological insights. *Tropical Plant Biology*, *3*, 136-150. doi 10.1007/s12042-010-9055-0
21. Siriwardhana, N., Shahidi, F., & Jeon, Y. J. (2006) .Potential antioxidative effects of cactus pear fruit (*Opuntia ficus-indica*) extract on radical scavenging and DNA damage reduction in human peripheral lymphocytes. *Journal of Food Lipids*, *13*, 445–458.
22. Gentile, C., Tesoriere, L., Allegra, M., Livrea, M. A., & D'Alessio, P. (2004).Antioxidant Betalains from Cactus Pear (*Opuntia ficus-indica*) Inhibit Endothelia ICAM-1 Expression. *New York Academy of Sciences*, *1028*, 481-486. doi: 10.1196/annals.1322.057
23. Aires, V., Adote, S., Hichami, A., Moutairou, K., Boustani, E. E., & Khan, N. A. (2004). Modulation of intracellular calcium concentrations and T cell activation by prickly pear polyphenols. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *260*, 103-110.
24. Allegra, M., Ianaro, A., Tersigni, M., Panza, E., Tesoriere, L., & Livrea, M. A. (2014). Indicaxanthin from cactus pear fruit exerts anti-inflammatory effects in carrageenin-induced rat pleurisy1,2. *Journal of Nutrition*, *144*, 185-192. doi:10.3945/jn.113.183657
25. El-Razek, F. H. A., Hassan, A. (2011). Nutritional value and hypoglycemic effect of prickly cactus pear (*Opuntia Ficus-Indica*) fruit juice in alloxan-induced diabetic rats. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, *5*(10), 356-377.
26. Galati, E. M., Mondello, M. R., Lauriano, E. R., Taviano, M. F., Galluzzo, M., Miceli, N. (2005). *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. fruit juice protects liver from carbon tetrachloride induced injury. *Phytotherapy Research*, *19*, 796-800. doi: 10.1002/ptr.1741
27. McGuire, R. G. (1992). Reporting of objective color measurements. *HortScience*, *27*(12), 1254-1255.
28. Kharrassi, Y. E., Mazri, M. A., Benyahia, H., Benaouda, H., Nasser, B., & Mzouri, M. (2016). Fruit and juice characteristics of 30 accessions of two cactus pear species (*Opuntia ficus indica* and *Opuntia megacantha*) from different regions of Morocco. *LWT - Food Science and Technology*, *65*, 610-617. doi:10.1016/j.lwt.2015.08.0440023-6438/
29. Castellanos-Santiago, E., & Yahia, E. M. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass

- spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5758-5764. doi: 10.1021/jf800362t
30. Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
 31. Teixeira, D. M., Patão, R. F., Coelho, A. V., Coelho, A. V., & Costa, C. T. (2006). Comparison between sample disruption methods and solid-liquid extraction (SLE) to extract phenolic compounds from *Ficus carica* leaves. *Journal of Chromatography A*, 1103, 22-28. doi:10.1016/j.chroma.2005.11.047
 32. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, Min., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9/10), 1231-1237.
 33. 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 E1. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337-41. doi: 10.1006/abio.1999.4019
 34. Mata, A. T., Proença, C., Ferreira, Serralheiro, M. L. M., Nogueira, J. M. F., & Araújo, M. E. M. (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, 103, 778-786.
 35. Parish, J. & Felker, P. (1997). Fruit quality and production of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones selected for increased frost hardiness. *Journal of Arid Environments*, 37, 123-143. doi: 10.1006/jare.1997.0261
 36. Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., Akoh, C. C., Bunch, R., & Felker, P. (2005). Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 442-451. doi: 10.1021/jf048751y
 37. Yahia, E. M. & Mondragon-Jacobo, C. (2011). Nutritional components and antioxidant capacity of ten cultivars and lines of cactus pear fruit (*Opuntia* spp.). *Food Research International*, 44, 2311-2318. doi: 10.1016/j.foodres.2011.02.042
 38. Saenz, C. (2000). Processing technologies: an alternative for cactus pear (*Opuntia* spp.) fruits and cladodes. *Journal of Arid Environments*, 46, 209-225. doi:10.1006/jare.2000.0676
 39. Gurrieri, S., Miceli, L., Lanza, M., Tomaselli, F., Bonomo, R. P., Rizzarelli, E. (2000). Chemical characterization of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) and perspectives for the storage of its juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5424-5431. doi:10.1021/jf9907844
 40. Vargas, P. N., Hoelzel, S. C., & Rosa, C. S. (2008). Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais. *Alimentos e Nutrição*, 19(1), 11-15.
 41. Magalhães, L. M., Santos, F., Segundo, M. A., Reis, Salette, & Lima, J. L. F. C. (2010). Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*, 83, 441-447.
 42. Fernández-López, J. A., Almeida, L., Obón, J. M., Castellar, R. (2010). Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits. *Plant Foods Hum Nutr*, 65, 253-259. doi: 10.1007/s11130-010-0189-x
 43. Butera, D., Tesoriere, L., Gaudio, F. D., Bongiorno, A., Allegra, M., Pintaudi, A M., Kohen, R., & Livrea, M. A. (2002). Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6895-6901. doi: 10.1021/jf025696p

44. Barker, S. A. (2000). Matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 885, 115-127.
45. Astello-Garcia, M. G., Cervantes, I., Nair, V., Santos-Díaz, M. S., Reyes-Aguero, A., Guéraud, F., Negre-Salvayre, A., Rossignol, M., Cisneros-Zevallos, L., & Rosa, A. P. B. (2015). Chemical composition and phenolic compounds profile of cladodes from *Opuntia* spp. cultivars with different domestication gradient. *Journal of Food Composition and Analysis*, 43, 119-130. doi:10.1016/j.jfca.2015.04.016
46. Guevara-Figueroa, T., Jiménez-Islas, H., Reyes-Escogido, M. L., Mortensen, A. G., Laursen, B. B., Lin, L., León-Rodríguez, A. L., Fomsgaar, I. S., & Rosa, A. B. (2010). Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 525-532. doi:10.1016/j.jfca.2009.12.003
47. Cho, D., Kim, D., Lee, D., Jung, K., Hurh, B., Kwon, O. W., Kim, & S. Y. (2014). Metabolite profiling of enzymatically hydrolyzed and fermented forms of *Opuntia ficus-indica* and their effect on UVB-induced skin photoaging. *Archives of Pharmacal Research*, 37, 1159-1168. doi:10.1007/s12272-013-0320-2
48. Chougui, N., Djerroud, N., Naraoui, F., Hadjal, S., Aliane, K., Zeroual, B., & Larbat, R. (2015). Physicochemical properties and storage stability of margarine containing *Opuntia ficus-indica* peel extract as antioxidante. *Food Chemistry*, 173, 382-390. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.025
49. Benayad, Z., Martinez-Villaluenga, C., Frias, J., Gomez-Cordoves, C., & Es-Safi, N. E. (2014). Phenolic composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from Moroccan *Opuntia ficus-indica* flowers obtained by different extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 62, 412-420. doi:10.1016/j.indcrop.2014.08.046
50. Stintzing, C. F., Schieber A., Carle, R., (2002). Identification of betalains from yellow beet (*Beta vulgaris* L.) and cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2302-2307. doi: 10.1021/jf011305f
51. Fernández-López, J. A., Castellar, R., Obón, J. M., & Almela, L. (2007). Monitoring by liquid chromatography coupled to mass spectrometry the impact of pH and temperature on the pigment pattern of cactus pear fruit extracts. *Journal of Chromatographic Science*, 45, 120-125.
52. Campos, M. G., & Markham, K. R. (2007). Phenolic Acids. In: Campos, M. G. et al. (1º Edição), *Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: Flavones, Flavonols and Phenolic Acids* (pp. 17). Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra.
53. Campos, M. G., & Markham, K. R. (2007). Flavones. In: Campos, M. G. et al. (1º Edição), *Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: Flavones, Flavonols and Phenolic Acids* (pp. 19). Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra.
54. Campos, M. G., & Markham, K. R. (2007). Phenolic Acids. In: Campos, M. G. et al. (1º Edição), *Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: Flavones, Flavonols and Phenolic Acids* (pp. 47). Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra.
55. (1993). PubChem. Consultado em Junho, 2016 em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/13962928#section=Biological-Test-Results>

56. Behling, E. B., Sendão, M. C., Francescato, H. D. C., Antunes, L. M. G., Bianchi, M. L. P. (2004). Flavonóide Quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas, *Alimentos e Nutrição*, 15(3), 285-292.
57. Dhaouadi, K., Raboudi, F., Funez-Gomez, L., Pamies, D., Estevan, C., Hamdaoui, M., Fattouch, S. (2013). Polyphenolic Extract of Barbary-Fig (*Opuntia ficus-indica*) syrup: RP–HPLC–ESI–MS analysis and determination of antioxidant, antimicrobial and cancer-cells cytotoxic potentials. *Food Analytical Methods*, 6, 45-53. doi:10.1007/s12161-012-9410-x
58. Campos, M. G., & Markham, K. R. (2007). Flavonols. In: Campos, M. G. et al. (1º Edição), *Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: Flavones, Flavonols and Phenolic Acids* (pp. 108). Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra.
59. Morris, M. C., Evans, D. A., Bienias, J. L., Tangney, C. C., Bennett, D. A., Aggarwal, N., Wilson, R. S., & Scherr, P A. (2002). Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study. *JAMA*, 287(24), 3230-3237.
60. Trevisan, M. T. S. & Macedo, F. V. V. (2003). Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. *Química Nova*, 26(3), 301-304.
61. Sereniki, A., Vital, M. A. B. F. (2008). A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. *Revista Psiquiátrica RS*, 30. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81082008000200002>