

Susana Margarida Abrantes Soutinho

AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E DA
ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FRUTOS VERMELHOS
PRODUZIDOS EM MODO BIOLÓGICO

Dissertação

Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar

Trabalho efetuado sob orientação de
Professora Doutora Raquel Guiné

Trabalho co-orientado por
Professor Doutor António Jordão – ESAV
Professor Doutor Fernando Gonçalves – ESAV



Outubro de 2012

As doutrinas expressas neste trabalho são da exclusiva responsabilidade do autor.

“Sem sonhos a vida não tem brilho
Sem metas o sonho não tem alicerce e
Sem prioridades os sonhos não se tornam reais”
Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação só foi possível graças à colaboração e ao contributo, de forma direta ou indireta, de várias pessoas, às quais gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento e profundo reconhecimento, em particular:

À Professora Doutora Raquel Guiné, minha orientadora e aos meus co-orientadores, Professor Doutor António Jordão e Fernando Gonçalves, pela disponibilidade manifestada para orientar este trabalho, pela exigência de método e rigor, pela incansável orientação científica, pela revisão crítica do texto, esclarecimentos, opiniões e sugestões, pela cedência e indicação de alguma bibliografia relevante, pela acessibilidade e simpatia demonstradas, pela confiança que sempre me concederam e pelo permanente estímulo que, por vezes, se tornaram decisivos em determinados momentos da elaboração desta tese.

À Empresa Vasco Pinto & Agostinho Sousa, Lda., em especial ao Sr. Vasco da Rocha Pinto, que me facultaram as amostras, sem as quais, não teria sido possível este trabalho, bem como todo o apoio, grande amizade e colaboração prestadas.

À Mestre Sandra Santos pela ajuda e apoio prestado na componente prática deste trabalho.

Ao pessoal dos Laboratórios, em especial ao Engenheiro Rui Coutinho, sempre pronto a auxiliar na componente laboratorial.

Aos meus colegas de turma, em especial, ao Miguel, Ângela, Tatiana, Rafaela e Daniela pelos bons momentos passados no Laboratório, no qual existiu bastante interajuda e companheirismo.

Ao meu grande amigo Jorge Pinto pela preciosa ajuda informática, colaboração e disponibilidade ao longo de todo o tempo de trabalho.

Por último, mas não menos importante, aos meus pais, irmã e namorado, pelo apoio e compreensão inestimáveis, pelos diversos sacrifícios suportados e pelo constante encorajamento a fim de prosseguir a elaboração deste trabalho.

RESUMO

A agricultura biológica distingue-se de outros métodos de produção pela sua ação construtiva e equilibrada nos sistemas agrícolas. Atualmente tem aumentado o interesse por alimentos de produção biológica. Paralelamente, tem aumentado a procura de frutos vermelhos, dado o seu elevado teor em compostos fitoquímicos biologicamente ativos, capazes de retardar o aparecimento de doenças, contribuindo para a saúde e bem-estar do Homem.

Neste trabalho foram estudados três frutos vermelhos, a framboesa, a groselha e o mirtilo, produzidos em modo de produção biológico. As amostras dos frutos foram recolhidas em seis datas entre o início e o fim da maturação. Com a execução deste trabalho pretendeu-se estudar a evolução do teor em compostos fenólicos e da capacidade antioxidante destes frutos vermelhos ao longo da maturação.

Os resultados obtidos mostraram que, no final da maturação, no mirtilo, de entre os frutos estudados, foi onde se obtiveram teores mais elevados de compostos fenólicos totais, antocianinas e taninos. A análise por HPLC permitiu identificar a presença de antocianinas monoméricas e de ácidos fenólicos (benzóicos e cinâmicos) na framboesa, na groselha e no mirtilo.

Em relação à capacidade antioxidante determinada pelo método DPPH, os valores apresentados nos três frutos foram semelhantes. No método ABTS, foi no mirtilo que se obteve maior poder antioxidante no extrato metanol e na groselha no extrato acetona.

PALAVRAS-CHAVE: framboesa, groselha, mirtilo, agricultura biológica, antioxidante, fenóis totais, antocianinas totais, grau de polimerização, taninos totais, ácidos fenólicos.

ABSTRACT

Organic farming differs from other methods of production for its balanced and constructive action in agricultural systems. Currently there has been increasing interest in organically produced food. In parallel, has increased the demand for fruits, given their high content of biologically active phytochemical compounds capable of delaying the onset of diseases, contributing to the health and welfare of man.

This work studied three red fruits, raspberry, gooseberry and blueberry, produced in organic production. Samples of the fruit were collected in six dates between the beginning and the end of maturation. With the execution of this work was intended to study the evolution of the content of phenolic compounds and antioxidant capacity of red fruits throughout maturation.

Results showed that by the end of ripening, the blueberry, among fruits studied, was the fruit where the higher content of phenolics, anthocyanins and tannins was obtained. HPLC analysis allowed to identify the presence of monomeric anthocyanins and phenolic acids (benzoic and cinnamic) in raspberry, gooseberry and the blueberry.

Regarding the antioxidant capacity determined by DPPH method, the values were similar in the three fruits. In ABTS assay, in blueberry greater antioxidant power was obtained in the methanol extract while in the gooseberry that happened in the acetone extract.

KEYWORDS: raspberry, gooseberry, blueberry, organic farming, antioxidant, total phenolics, total anthocyanins, degree of polymerization, total tannins, phenolic acids.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE GERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABELAS	xi
I. INTRODUÇÃO	1
1. ENQUADRAMENTO GERAL	2
2. OBJECTIVOS	4
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3. AGRICULTURA	6
3.1. Agricultura Convencional <i>versus</i> Biológica	7
3.2. A Agricultura Biológica em Portugal	9
4. CARACTERIZAÇÃO GERAL DOS FRUTOS VERMELHOS	12
4.1. Framboesa	13
4.2. Groselha	16
4.3. Mirtilo	17
5. OS COMPOSTOS FENÓLICOS	20
5.1. Compostos não-flavonóides	21
5.2. Compostos flavonóides	23
6. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE	30
6.1. Antioxidantes	30
6.2. Radicais Livres	32
6.3. Stress Oxidativo	35
6.4. Avaliação da Capacidade Antioxidante – DPPH/ABTS	36
III. MATERIAL E MÉTODOS	39
7. AMOSTRAS	40
8. MÉTODOS UTILIZADOS	41
8.1. Método de Extração dos Compostos Fenólicos	41
8.2. Quantificação dos Compostos Fenólicos Totais	42
8.3. Fracionamento dos Compostos Fenólicos	42
8.4. Quantificação dos Taninos Totais	43

8.5. Quantificação das Antocianinas Totais.....	44
8.6. Determinação da Percentagem de Polimerização das Antocianinas	45
8.7. Identificação e quantificação das Antocianinas monoméricas	45
8.8. Identificação e quantificação dos Ácidos Fenólicos	47
8.9. Determinação da Capacidade Antioxidante.....	48
9. Tratamento Estatístico	49
IV. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	50
10. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	51
10.1. Compostos Fenólicos Totais	51
10.2. Taninos Totais.....	54
10.3. Antocianinas	55
10.4. Análise dos Ácidos Fenólicos por HPLC	61
10.5. Capacidade Antioxidante	63
10.6. Correlação da composição fenólica com a atividade antioxidante	66
V. CONCLUSÕES.....	67
11. CONCLUSÕES	68
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
VI. ANEXOS.....	80
Anexo A	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolução do número de Empresas em MPB (Produções Vegetais). Fonte: IDRHa.	10
Figura 2. (a) Evolução da área de Fruticultura, Frutos Secos e Vinha (b) Evolução da área de Pastagens/Forragens, Culturas Arvenses e Olival. Fonte: IDRHa.....	11
Figura 3. Morfologia da framboesa. Adaptado de Oliveira <i>et al.</i> (2007).....	15
Figura 4. Tonalidades da framboesa vermelha. Fonte: Oliveira <i>et al.</i> (2007).....	15
Figura 5. Frutos de groselha.	16
Figura 6. Frutos de mirtilo.	17
Figura 7. Estrutura química geral dos ácidos benzóicos e cinâmicos. Adaptado de Gonçalves (2007).	21
Figura 8. Estrutura geral dos estilbenos. Adaptado de Gonçalves (2007).	23
Figura 9. Estrutura geral das isoflavonas. Adaptado de Gonçalves (2007).	23
Figura 10. Estrutura química do núcleo flavânico. Adaptado de Gonçalves (2007).	24
Figura 11. Estrutura de antocianidinas 3-glucósido. Adaptado de Gonçalves (2007).	26
Figura 12. Estrutura química do ácido elágico e do ácido gálico. Adaptado de Del Rio <i>et al.</i> , (2010).	27
Figura 13. Estrutura química geral dos flavan-3-óis.	28
Figura 14. Estrutura química dos flavan-3-óis monómeros e de alguns dímeros identificados nos frutos. Adaptado de Del Rio <i>et al.</i> , (2010).....	28
Figura 15. Ataque de radicais livres através das mitocôndrias.	33
Figura 16. Defesas antioxidantes enzimáticas.	34
Figura 17. Defesas antioxidantes não enzimáticas.	34
Figura 18. Principais causas e consequências da acção dos radicais livres. Adaptado de Ferreira e Abreu (2007).	36
Figura 19. Radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo (DPPH) (1) e na sua forma reduzida (2).	37
Figura 20. Radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS)	37
Figura 21. Exemplo de mudança de cor do radical DPPH após reagir com antioxidante. Adaptado de Pereira (2010).	38
Figura 22. Imagens da Empresa Vasco Pinto & Agostinho Sousa, Lda.	40
Figura 23. Ilustração da extração dos compostos fenólicos das amostras.	41
Figura 24. Fracionamento das amostras por colunas apolares de C ₁₈	43
Figura 25. Sistema de cromatografia utilizado.	46

Figura 26. Evolução dos compostos fenólicos totais obtidos na framboesa ao longo da maturação nos dois extratos obtidos.....	51
Figura 27. Evolução dos compostos fenólicos totais obtidos na groselha ao longo da maturação nos dois extratos obtidos.....	52
Figura 28. Evolução dos compostos fenólicos totais obtidos no mirtilo ao longo da maturação nos dois extratos obtidos.	52
Figura 29. Evolução dos teores em compostos fenólicos totais nos três frutos estudados ao longo da maturação.	53
Figura 30. Teor em compostos fenólicos totais nos três frutos estudados no final da maturação. Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).	54
Figura 31. Evolução dos teores em taninos totais nos frutos estudados ao longo da maturação.....	54
Figura 32. Teores em taninos totais nos frutos em estudos no final da maturação. Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).	55
Figura 33. Evolução dos teores em antocianinas totais quantificadas nos frutos estudados ao longo da maturação.	55
Figura 34. Quantificação do teor em antocianinas totais nos frutos estudados no final da maturação. Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).	56
Figura 35. Evolução da percentagem de polimerização das antocianinas encontradas na framboesa ao longo da maturação.....	57
Figura 36. Evolução da percentagem de polimerização das antocianinas encontradas na groselha ao longo da maturação.....	58
Figura 37. Evolução da percentagem de polimerização das antocianinas encontradas no mirtilo ao longo da maturação.....	58
Figura 38. Perfil cromatográfico relativo às antocianinas monoméricas quantificadas na framboesa, na groselha e no mirtilo no final da maturação. (1) delphinidina-3-glucósido (2) cianidina-3-glucósido (3) petunidina-3-glucósido (4) peonidina-3-glucósido (5) malvidina-3-glucósido (6) petunidina-3-acetilglucósido (7) malvidina-3-acetilglucósido.	59
Figura 39. Perfis cromatográficos (280 e 325 nm) relativos aos ácidos fenólicos quantificados nos frutos em estudo, no final da maturação. (1) gálico (2) protocatequínico (3) caftárico (4) <i>p</i> -hidroxibenzóico (5) clorogénico (6) vanílico (7) sirínico (8) cumárico (9) hidroxicinâmico (10) ferúlico.	61
Figura 40. Evolução da capacidade antioxidante quantificada no extrato metanol pelo método DPPH, ao longo da maturação nos três frutos estudados.	63

Figura 41. Evolução da capacidade antioxidante quantificada no extrato acetona pelo método DPPH, ao longo da maturação dos três frutos estudados.	64
Figura 42. Capacidade antioxidante quantificada nos frutos estudados, pelo método DPPH, no final da maturação. Letras iguais indicam que os valores são estatisticamente iguais ($p < 0,05$).	64
Figura 43. Evolução da capacidade antioxidante quantificada no extrato metanol pelo método ABTS, ao longo da maturação nos três frutos estudados.	65
Figura 44. Evolução da capacidade antioxidante quantificada no extrato acetona pelo método ABTS, ao longo da maturação nos três frutos estudados.	65
Figura 45. Capacidade antioxidante quantificada nos frutos estudados, pelo método ABTS, no final da maturação. Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).	66

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Variação do número de explorações/área desde 1989 a 1999 em Portugal Continental.	13
Tabela 2. Espécies de framboesa mais importantes do ponto de vista frutícola.....	14
Tabela 3. Ácidos fenólicos (benzóicos e cinâmicos) livres presentes na framboesa e na groselha.....	22
Tabela 4. Ácidos fenólicos (benzóicos e cinâmicos) conjugados presentes na framboesa e na groselha.....	22
Tabela 5. Principais antocianinas presentes nos frutos vermelhos.	26
Tabela 6. Concentrações de flavan-3-óis monómeros, dímeros, trímeros e procianidinas totais existentes nos frutos vermelhos (mg/kg fresco).....	29
Tabela 7. Mecanismos de acção dos antioxidantes.	31
Tabela 8. Identificação das amostras recolhidas.....	40
Tabela 9. Condições de extração do método utilizado.	41
Tabela 10. Gradiente de eluição utilizado na análise das antocianinas individuais dos frutos analisados por HPLC.....	46
Tabela 11. Gradiente de eluição utilizado na análise dos ácidos fenólicos dos frutos analisados por HPLC.....	47
Tabela 12. Concentrações obtidas das antocianinas identificadas nos frutos estudados no final da maturação.	60
Tabela 13. Concentrações obtidas dos ácidos fenólicos identificados nos frutos estudados no final da maturação.	62
Tabela 14. Correlação dos resultados obtidos entre a composição fenólica e a atividade antioxidante dos frutos estudados ao longo da maturação.....	66

I. INTRODUÇÃO



1. ENQUADRAMENTO GERAL

A agricultura é uma atividade que tem como objectivo a exploração de recursos do solo, a fim de satisfazer as necessidades essenciais do Homem e do seu habitat.

A agricultura convencional é, de uma maneira geral, perniciosa para o ambiente. Inclui práticas como a queima de resíduos de culturas ou a inversão da camada superficial do solo, a mobilização para controlo de infestantes e preparação da cama de semente. Estas técnicas aumentam consideravelmente a compactação do solo, a erosão e a contaminação dos cursos de água com sedimentos, fertilizantes e pesticidas. Aumentam as emissões de dióxido de carbono para a atmosfera, contribuindo para o aquecimento global, e diminuindo a sustentabilidade da agricultura, ao diminuir os teores de matéria orgânica e fertilidade do solo, entre outros efeitos ambientais negativos como a biodiversidade.

Surge então a agricultura biológica que se distingue de outros sistemas de produção porque exclui quase todos os produtos químicos de síntese, recorre a rotações culturais, resíduos das culturas, estrumes de animais, siderações, e todos os resíduos orgânicos da exploração. As técnicas utilizadas contribuem para o equilíbrio do ecossistema através da luta biológica, reduzindo assim a poluição.

Os frutos vermelhos são alimentos bastante completos e devem fazer parte de uma dieta equilibrada. Estudos recentes efetuados nos EUA mostraram que no grupo dos pequenos frutos, no qual se incluem a framboesa, o mirtilo e a groselha, cada espécie possui teores característicos e específicos de compostos fenólicos, constituídos essencialmente por antocianinas, flavonóis, proantocianidinas e ácidos fenólicos, catequinas e isoflavonoides, compostos reconhecidos pela sua capacidade antioxidante (Sousa *et al.*, 2007).

O mirtilo (*Vaccinium corymbosum*) é conhecido por conter níveis consideráveis de compostos fenólicos, incluindo antocianinas, flavonóides e procianidinas que têm alta atividade biológica, fornecendo benefícios para a saúde como antioxidantes (Koca *et al.*, 2009). A framboesa (*Rubus Idaeus*), também bastante rica em compostos fenólicos principalmente em antocianinas, contém cianidina-3-soforósido e cianidina-3-glucósido (Mullen *et al.* 2002). A groselha (*Phyllanthus distichus*) é constituída por pequenas bagas vermelhas que crescem

em cachos. É particularmente rica em vitamina C, especialmente a groselha negra e a vermelha. Age eficazmente como inibidor de radicais livres, possuindo uma grande diversidade de fitoquímicos antioxidantes (Pantelidis *et al.*, 2007).

De entre os fitoquímicos existentes nas plantas, os compostos fenólicos representam a classe mais abundante de produtos naturais vegetais, existindo já uma longa história de investigação científica sobre estes. Os compostos fenólicos apresentam múltiplas atividades biológicas tais como propriedades anti tumorais, anti mutagénicas, anti-inflamatórias, antibacterianas e antioxidantes, por poderem proteger as células contra os danos oxidativos (Sousa, 2008).

Os radicais livres são espécies químicas constituídas por um átomo ou associação dos mesmos, que possuem um eletrão desemparelhado na sua órbita mais externa, causando uma alta instabilidade energética e cinética. A formação destes compostos conduz ao stress oxidativo, levando à formação de uma cadeia de reacções, originando alterações em proteínas extra celulares e a modificações celulares. O maior dano causado pelo stress oxidativo é a peroxidação dos ácidos gordos constituintes da dupla camada lipídica que, em última instância, leva à morte celular (Hirata *et al.*, 2004). De facto, a produção não controlada de radicais livres foi já associada como causa, ou como estando relacionada com muitas doenças incluindo: vários tipos de cancro, diabetes, cirrose, doenças cardiovasculares e desordens do foro neurológico, entre outras (Ferreira e Abreu, 2007).

2. OBJECTIVOS

Com a execução do presente trabalho pretendeu-se avaliar o efeito do modo de produção biológico de alguns frutos vermelhos (framboesa, groselha e mirtilo) no que respeita às seguintes componentes:

- 1) quantificar os compostos fenólicos totais nos dois extratos estudados;
- 2) quantificar os taninos totais;
- 3) quantificar as antocianinas totais e o grau de polimerização;
- 4) identificar e quantificar as antocianinas monoméricas e os ácidos fenólicos por HPLC;
- 5) determinar a capacidade antioxidante nos dois extratos estudados;
- 6) correlacionar a composição fenólica com a atividade antioxidante;

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



3. AGRICULTURA

Quando se fala de agricultura, não se trata apenas de falar dos problemas técnicos como sejam fertilizar os campos, que produtos escolher ou como combater os insetos nocivos às culturas de forma a tornar rentável as produções. Trata-se sim, de falar de uma forma de estar perante a vida, perante a natureza, com a energia, com o trabalho, com toda a engrenagem que move o sistema de quem decide e organiza o futuro da humanidade, que é também o nosso futuro. É pois importante saber qual o caminho a seguir, sabendo que se torna crucial uma nova relação com o equilíbrio biológico do planeta, baseado no respeito e na reciprocidade, ao contrário da exploração unívoca dos recursos por parte do homem (Simões, 2007). A agricultura é uma atividade que tem como objectivo a exploração de recursos do solo, a fim de satisfazer as necessidades essenciais do Homem e do seu habitat, sendo a atividade que mais área ocupa na superfície da terra e a principal atividade para a maior parte da população mundial. Em 1999, mais de 37% da superfície terrestre era ocupada por culturas e pastagens e dois terços do consumo de água era devido à agricultura (Cunha *et al.*, 2005).

A natureza específica da atividade agrícola e do meio social em que esta se desenvolve, conjugada com o modo como a agricultura se acha inserida nas formações sociais contemporâneas, concorre para tornar especialmente diversificadas e complexas as modalidades segundo as quais, o trabalho agrícola se realiza e organiza e o quadro de situações e relações sociais estruturante da população trabalhadora agrícola. A agricultura surge como o domínio onde as formas de organização produtiva e os sistemas tecnológicos nascidos com a revolução industrial e desenvolvidos pelo modo de produção capitalista encontram maiores obstáculos de aplicação e plena afirmação (Barros *et al.*, 1983).

As atividades rurais desenvolvem-se em estreito contacto com a Natureza, acrescentando-lhe valor através da produção de recursos renováveis; no entanto, a sobre-exploração dos recursos e a utilização de práticas culturais incorretas podem torná-la vulnerável. A maior parte dos alimentos produzidos a nível mundial é obtida em sistemas de produção intensivos (agricultura convencional), o que tem contribuído para a compactação do solo, o aparecimento e desenvolvimento de problemas ambientais: teores elevados de nitratos nas águas, eutrofização, resíduos

de pesticidas, redução da biodiversidade, degradação e erosão dos solos e redução da camada de ozono. A sociedade exige assim que, cada vez mais, no processo de produção agrícola, não haja degradação do meio ambiente, pelo que assume cada vez mais relevância a implementação de sistemas de produção mais sustentáveis. É fundamental desenvolver e utilizar tecnologias seguras e corretas que promovam a produção, mantenham ou melhorem a fertilidade dos solos, assegurem a reciclagem dos nutrientes, conservem a água e a energia e controlem os inimigos das culturas (Cunha *et al.*, 2005).

3.1. Agricultura Convencional versus Biológica

A agricultura intensiva recorrendo a grandes quantidades de fertilizantes, pesticidas, elevadas horas de trabalho e elevado capital investido em práticas agrícolas severas, tornou possível produzir alimentos suficientes para satisfazer as necessidades globais atuais. No entanto, estas práticas conduziram a uma mudança do uso do solo, levando a danos ambientais e à degradação dos ecossistemas, tais como, o controle biológico de pragas, plantas daninhas e doenças, polinização das culturas, prevenção da erosão do solo, absorção do carbono pelas plantas e pelo solo, bem como, o normal desenvolvimento das culturas. Como tal, estes ecossistemas vão-se degradando a larga escala, o que representa uma séria ameaça à qualidade de vida dos seres vivos (Sandhu *et al.*, 2010).

É certo que a modernização da agricultura resolvera os problemas alimentares da Europa, mas ao mesmo tempo, "produzia" outros, nomeadamente no domínio do ambiente como por exemplo a alteração da qualidade das águas, dos solos, o desrespeito pela fauna e flora e a alteração da imagem e da marca dos produtos e ou do bem-estar animal. Na realidade, um sistema que faz depender o apoio concedido à agricultura em função das quantidades produzidas favorece a intensificação dos métodos de produção agrícola e é sinónimo de exploração abusiva da natureza. Muitas são as marcas visíveis resultantes do rompimento da relação simbiótica entre agricultura/ambiente como a nitrificação das águas freáticas e de superfície conducentes à eutrofização ou inquinação destas; acumulação de dejetos de animais; redução da biodiversidade devido à utilização excessiva de pesticidas e herbicidas que levam a uma maior vulnerabilidade das plantas e dos animais, limitando a sua reprodução; repercussões dos pesticidas e dos seus

resíduos, na saúde dos seres vivos; e a erosão dos solos devido à degradação causada pela monocultura intensiva.

A crescente intensificação dos métodos de produção agrícola e pecuária, geradores de elevados impactos ambientais negativos, fizeram despontar preocupações críticas que apontam como alternativa, a necessidade de promover o Desenvolvimento Sustentável. Este conceito emerge no princípio da década de setenta, com a realização da 1ª Conferência Internacional sobre o Ambiente em Estocolmo e a criação do Parque das Nações Unidas para o Desenvolvimento (UNEP), pela Comissão Mundial para o Ambiente e Desenvolvimento. Entendido como o desenvolvimento que satisfaz as necessidades atuais sem colocar em risco a possibilidade das gerações futuras satisfazerem as suas necessidades, este conceito veio revolucionar as estratégias políticas e económicas em vários sectores de atividade a nível mundial, nomeadamente na agricultura (Gonçalves, 2005).

Assim, surge a agricultura biológica que se distingue dos outros métodos de produção pela sua acção construtiva e equilibrada nos sistemas agrícolas. Para que seja praticável na sua máxima extensão, a agricultura biológica recorre a rotações culturais, com o objectivo de fertilizar o solo, melhorar a nutrição da planta e controlar ou limitar os problemas de produção associados a pragas, doenças e infestantes; recorre a resíduos orgânicos e culturas da exploração agrícola; recorre à luta biológica contra pragas e doenças e outras práticas culturais de modo a manter a produtividade do solo (Lampkin, 1990).

No fundo, são objetivos da agricultura biológica produzir alimentos de alta qualidade em quantidade suficiente, promover e desenvolver ciclos biológicos dentro do sistema de produção, envolvendo microrganismos, flora e fauna do solo, as plantas e os animais, manter e/ou aumentar a fertilidade do solo a longo prazo, promover o correto uso da água e a gestão racional dos recursos hídricos e da vida neles existentes, utilizar, sempre que possível, recursos renováveis nos sistemas agrícolas organizados, manter a biodiversidade dos sistemas agrícolas e do meio envolvente, incluindo a proteção dos habitats, de animais e plantas selvagens e por fim, evoluir no sentido de uma cadeia de produção inteiramente “biológica”, que seja ao mesmo tempo socialmente justa e ecologicamente responsável (Ferreira *et al.*, 2002).

A agricultura biológica proíbe o uso da maioria dos compostos inorgânicos para a nutrição da planta, o uso de compostos sintéticos para pragas, doenças e controle de infestantes e, mais recentemente, proíbe cultivares geneticamente modificadas (Connor, 2008).

No ano de 2000, a agricultura biológica controlada ocupava em todo o mundo cerca de 10,5 milhões de hectares, sendo a Oceania a ocupar a maior área (5,3 Mha), seguida da Europa (3,6 Mha), América do Norte (1,1 Mha), América Latina (0,5 Mha), Ásia (0,04 Mha) e África (0,02 Mha) (Willer & Yussef, 2000).

3.2. A Agricultura Biológica em Portugal

Em Portugal, a área cultivada em agricultura biológica só recentemente começou a ter algum significado. Até à década de oitenta as culturas sob o modo de produção biológico restringiam-se a áreas muito pequenas, sendo a maioria delas exploradas por estrangeiros, que complementavam a produção de alimentos biológicos para autoconsumo, com outras atividades relacionadas a um espírito comunitário e a um específico modo de vida mais próximo da Natureza. Mais recentemente, outros estrangeiros instalaram-se em Portugal com interesses comerciais mais vinculados e voltados para a exportação, dedicando-se a este modo de produção motivados pelo reduzido preço do solo, dos meios de produção e pelas condições edafo-climáticas favoráveis ao desenvolvimento de culturas com mercado assegurado nos seus países de origem. Paralelamente a estas experiências, alguns portugueses davam os primeiros passos, desenvolvendo a produção e comercialização de produtos biológicos: uns já eram agricultores e tinham reconvertido as suas explorações, enquanto outros foram motivados por questões "ideológicas" apesar de não terem qualquer tipo de experiência da prática agrícola. Excetuando estas "experiências pontuais", a expressão económica da agricultura biológica em Portugal manteve-se pouco relevante e incipiente até ao início da década de noventa do século passado.

Para o incremento do número de produtores, de explorações e áreas cultivadas, foi importante o contributo de instituições de apoio a este novo sistema de agricultura e de outras associações de produtores, mas também das ajudas financeiras e da capacidade técnica.

Este sistema de agricultura é controlado por Entidades Certificadoras que têm vindo a evoluir a sua estrutura técnica em função do crescimento da atividade. O controlo é feito mediante visitas às explorações que conduzem à elaboração de um relatório, o qual é apresentado à Comissão de Certificação, cuja missão é a de aplicação e acompanhamento das regras e critérios de atribuição e renovação das Licenças dos Atestados de Garantia, bem como das sanções (em último caso, das Suspensões de Certificação ou mesmo da Licença). Os produtores e transformadores certificados ficam sujeitos a um controlo anual detalhado que consiste, essencialmente, na inspeção dos terrenos de cultivo, dos locais de armazenamento e da contabilidade da exploração. Para além disto, são feitos controlos pontuais aos respetivos, sem aviso prévio, que incluem a realização de análises (Gonçalves, 2005).

De seguida, apresenta-se a evolução da agricultura biológica em Portugal desde o ano de 2000. Com a Reforma da Política Agrícola Comum de 1992 (proseguida no âmbito da Agenda 2000) e instituído o Desenvolvimento Rural como um segundo pilar da PAC, a União Europeia apoia financeiramente a utilização dos métodos de produção agrícola respeitadores do ambiente e da biodiversidade. Desde então, Portugal tem vindo a aumentar a reconversão das explorações para o Modo de Produção Biológico (Figura 1).

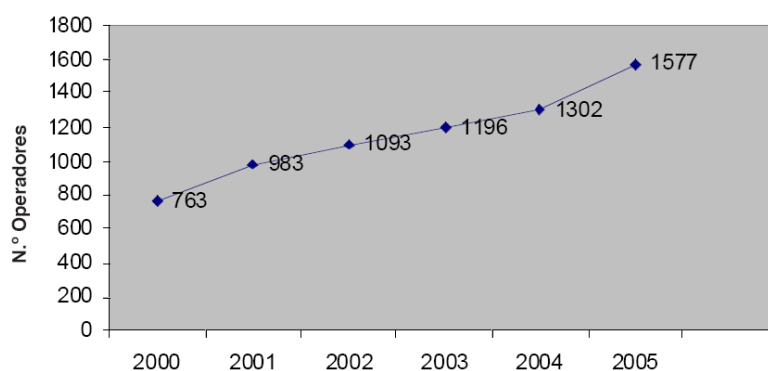


Figura 1. Evolução do número de Empresas em MPB (Produções Vegetais). Fonte: IDRHa.

O número de operadores, neste modo de produção vegetal, tem vindo a aumentar ao longo dos anos e relativamente à dispersão geográfica, constata-se

que o maior número de operadores se localiza nas regiões agrárias das áreas de intervenção da Direção Regional de Agricultura do Alentejo, Trás-os-Montes e Beira Interior. Os gráficos da Figura 2 apresentam as produções vegetais mais significativas em Portugal.

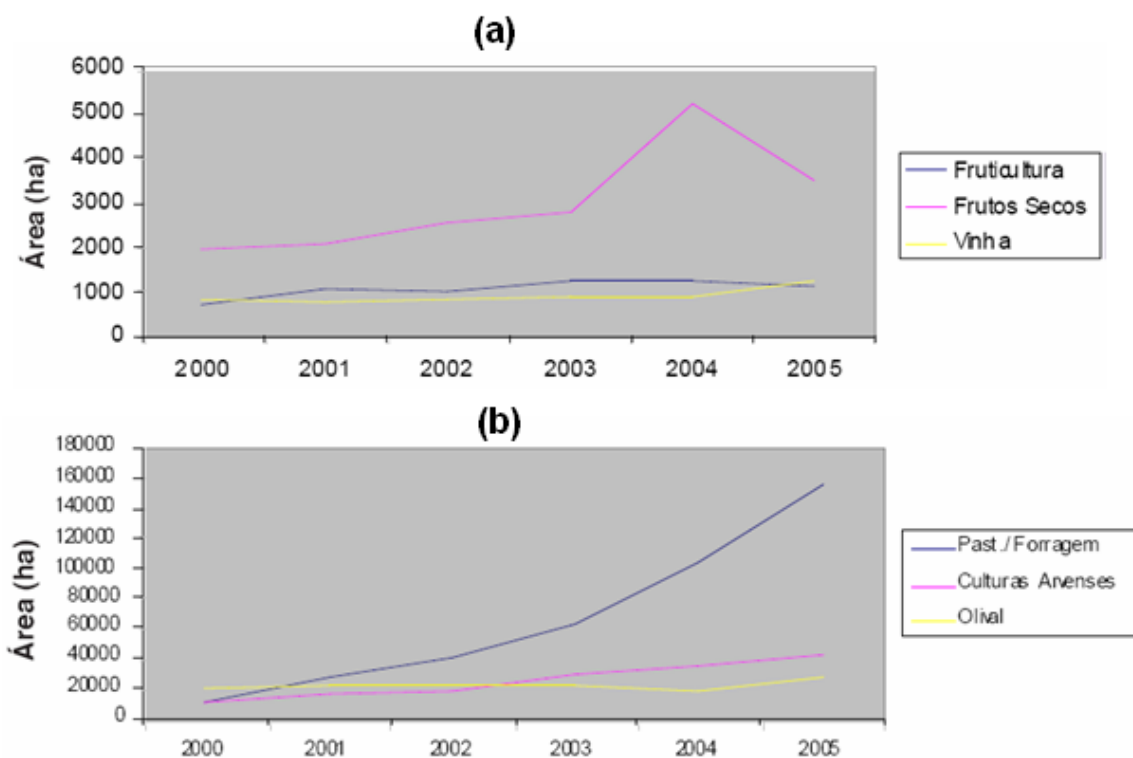


Figura 2. (a) Evolução da área de Fruticultura, Frutos Secos e Vinha (b) Evolução da área de Pastagens/Forragens, Culturas Arvenses e Olival. Fonte: IDRHa.

Apesar da evolução positiva a nível de área afeta à produção biológica, continuam a verificar-se alguns estrangulamentos que dificultam o crescimento do sector, nomeadamente, o acesso aos circuitos de comercialização e os custos com a certificação. As organizações de agricultores têm, também aqui, um papel muito importante a desempenhar no âmbito do Aconselhamento ao Agricultor (Dias, 2007).

A agricultura biológica continua a crescer num ambiente favorável já que tem dado provas de que é bastante rentável, que poderá permitir a fixação da população jovem nas aldeias, conferindo novamente identidade à ruralidade já há muito perdida (Gonçalves, 2005).

4. CARACTERIZAÇÃO GERAL DOS FRUTOS VERMELHOS

Desde os tempos pré-históricos que o Homem se tem sentido atraído pelos pequenos frutos ou frutos vermelhos, inserindo-os na sua alimentação. Estes frutos são muito apreciados devido à diversidade de formas, texturas, cores, sabores e aromas que podem apresentar quando consumidos em fresco. Desde sempre têm sido feitas referências quanto ao seu valor medicinal na cura ou alívio de sintomas de natureza diversa, nomeadamente do foro interno. Atualmente tem aumentado o interesse pelo consumo destes pequenos frutos dado os seus elevados teores em produtos fitoquímicos biologicamente ativos capazes de promover a saúde e retardar o aparecimento de incapacidades associadas a doenças crónicas e/ou degenerativas (Oliveira *et al.*, 2007).

No grupo destes pequenos frutos estão incluídas as plantas perenes de climas temperados, lenhosas ou semilenhosas que produzem frutos simples derivados apenas do tecido do ovário em que o pericarpo apresenta polpa e textura branda. Estão incluídas plantas de diversos géneros, de entre quais se destacam a framboesa (*Rubus*), a groselha (*Phyllanthus*) e o mirtilo (*Vaccinium*) (Oliveira *et al.*, 2007).

A cultura de pequenos frutos (excluída a cultura do morangueiro) continua a assumir uma expressão reduzida. A área total dedicada a estes frutos, embora tenha aumentado em 60% entre os censos de 1989 e 1999, apenas ocupava em 1999 cerca de 87 ha no continente português, como se pode observar na Tabela 1.

Os pequenos frutos constituem uma boa fonte de antioxidantes naturais, capazes de agirem eficazmente como inibidores de radicais livres. Existem também investigações sobre os seus teores em ácidos fenólicos, antocianinas e ácido ascórbico.

Os compostos fenólicos abrangem uma grande variedade de compostos divididos em várias classes (ácido hidroxibenzóico, hidroxicinâmico, antocianinas, proantocianinas, flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, estilbenos e lignanas) (Pantelidis *et al.*, 2007).

Segundo Cao *et al.*, (1996) e Wang *et al.*, (1996), também existem trabalhos que demonstram que estes frutos, para além de conterem nutrientes antioxidantes, contêm vitamina C, E, e carotenoides que contribuem significativamente para a sua capacidade antioxidante total (Su *et al.*, 2007).

Tabela 1. Variação do número de explorações/área desde 1989 a 1999 em Portugal Continental.

Regiões	1989	1999	Varição (%)
Número de Explorações			
Entre Douro e Minho	9	14	56
Trás-os-Montes e Alto Douro	13	22	69
Beira Litoral	5	51	920
Beira Interior	12	21	75
Ribatejo e Oeste	57	42	-26
Alentejo	8	70	775
Algarve	90	62	-31
Área (ha)			
Entre Douro e Minho	3,9	9,4	144
Trás-os-Montes e Alto Douro	7,6	14,2	87
Beira Litoral	2,1	9,3	336
Beira Interior	6,6	8,2	26
Ribatejo e Oeste	14,7	16,1	10
Alentejo	6,8	12,3	79
Algarve	10,7	17,2	62





Adaptado de Oliveira *et al.* (2007)

4.1. Framboesa

A framboesa pertence à família das *Rosaceae*, género *Rubus*, que inclui plantas herbáceas, perenes e bienais e está subdividido em elevado número de subgéneros. O subgénero *Idaeobatus*, onde estão incluídas as framboesas, aparece nos cinco continentes, mas tem a sua distribuição centrada fundamentalmente no hemisfério Norte, com especial incidência na Ásia, Europa e América do Norte (Oliveira *et al.*, 2007). Este subgénero engloba cerca de 200 espécies, que se distinguem pela facilidade com que os seus frutos maduros se separam do receptáculo. Muitas destas espécies têm sido melhoradas, mas apenas as framboesas vermelha e preta são produzidas em larga escala. A espécie mais comum no continente europeu é *Rubus idaeus* L.. Esta espécie ainda é atualmente abundante em algumas regiões da Europa (Sousa *et al.*, 2007).

Na Tabela 2, apresentam-se as espécies de framboesa mais importantes do ponto de vista frutícola.

Tabela 2. Espécies de framboesa mais importantes do ponto de vista frutícola.

Espécie comum	Nome científico	
Framboesa vermelha europeia	<i>Rubus idaeus</i> subsp. <i>vulgatus</i> Arrhen.	
Framboesa vermelha norte americana	<i>Rubus idaeus</i> subsp. <i>strigosus</i> Michx.	
Framboesa preta	<i>Rubus occidentalis</i> L.	
Framboesa púrpura e Híbridos framboesas vermelhas norte americanas vs framboesas pretas	<i>Rubus neglectus</i> Peck.	

Adaptado de Oliveira *et al.* (2007)

A framboesa é um fruto múltiplo de drupas (drupéolas) estreitamente unidas à volta do recetáculo, como ilustra a Figura 3. Apresenta em geral forma cónica arredondada, sendo cada drupéola, constituída por uma semente dura envolvida por polpa (Sousa *et al.*, 2007).

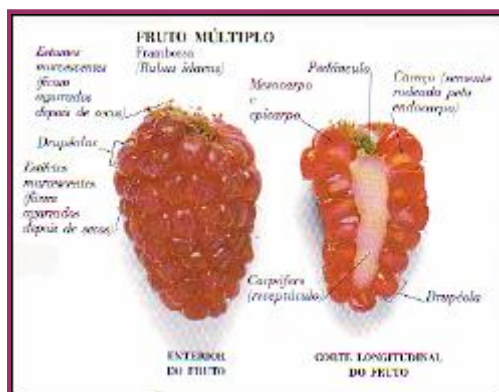


Figura 3. Morfologia da framboesa. Adaptado de Oliveira *et al.* (2007).

A framboesa floresce no Verão após um ano de crescimento vegetativo e passa por um período de dormência durante o Inverno (Oliveira *et al.*, 2007). O sistema radicular da framboesa é fasciculado, desenvolvendo-se na sua maior parte nos primeiros 25 cm do solo, constituindo a estrutura perene da planta. O número de frutos presentes num ramo varia consideravelmente, quer seja porque existiam poucas flores ou porque poucas flores vingaram e evoluíram para fruto (Mullen *et al.*, 2002).

De acordo com as espécies e as cultivares, a coloração dos frutos, tal como ilustra a Figura 4, varia do amarelo ao preto, incluindo os tons alaranjado, rosa, vermelho claro e intenso e púrpura (Sousa *et al.*, 2007).



Figura 4. Tonalidades da framboesa vermelha. Fonte: Oliveira *et al.* (2007).

As cultivares mais generalizadas e cultivadas em Portugal são as de fruto vermelho, de sabor agridoce, aroma agradável, polpa com pequenas sementes e textura granulada (Sousa *et al.*, 2007).

Ao longo da maturação, os açúcares e os ácidos na framboesa têm uma evolução inversa e a sua relação pode fornecer uma indicação do estado de maturação do fruto mas, não necessariamente, da sua qualidade gustativa. Um fruto com reduzido teor em açúcar pode também ser deficitário em ácidos. A maturação origina um grande número de compostos voláteis, em parte responsáveis pelo

aroma dos frutos e compostos não voláteis, os compostos fenólicos, especialmente os flavonóides, conhecidos pela sua capacidade de captar radicais livres (efeito antioxidante) (Sousa *et al.*, 2007).

Na sua composição em compostos fenólicos, principalmente em antocianinas, a framboesa contém fundamentalmente cianidina-3-soforósido e cianidina-3-glucósido (Mullen *et al.*, 2002). Do ponto de vista nutricional, a framboesa apresenta grande interesse, pelos seus teores em sais minerais e vitaminas C, provitamina A, vitaminas B1, B2 e B6, pela presença de pectina, celulose e ácido salicílico (Sousa *et al.*, 2007).

4.2. Groselha

A groselha (Figura 5) é uma excelente fonte de compostos fenólicos, tais como, antocianinas, flavonóides, procianidinas e ácidos fenólicos; sendo que, a sua quantidade em polifenóis totais varia entre 500 a 1342 mg/100 g de fruto (Bakowska-Barczak *et al.*, 2011). As antocianinas mais predominantes são a delphinidina e a cianidina (Hollands *et al.*, 2008) e variam entre 160 a 411 mg/100 g de fruto (Bakowska-Barczak *et al.*, 2011).



Figura 5. Frutos de groselha.

Existem diversos compostos fenólicos localizados principalmente na película da baga, tornando-a adstringente e amarga. Na polpa encontra-se a quercetina-3-O-rutinósida que, mesmo em baixas concentrações, é responsável pelo sabor adstringente. Mas, este sabor não advém apenas da presença de alguns compostos fenólicos, mas também, de alguns compostos nitrogenados pertencentes ao grupo

dos indóis e ao grupo dos nitrilos (Laaksonen *et al.*, 2011). Para além da quercetina, o caempferol é outro composto fenólico bastante predominante na baga da groselha (Pap *et al.*, 2010).

A groselha é tradicionalmente usada no fabrico de sumos, doces, geleias e xaropes (Laaksonen *et al.*, 2011).

4.3. Mirtilo

O mirtilo pertence à família das *Ericaceae*, subfamília das *Vaccinoiodae*, género *Vaccinium*. É uma baga de cor azul-ceroso, que cresce num pequeno arbusto que alcança 1m a 1,5m de altura (Serrado *et al.*, 2008), tal como demonstra a Figura 6.

A cor do mirtilo é influenciada pela presença de pruína, cera epicuticular, que produz o efeito glauco responsável pela cor azul típica dos mirtilos. Esta camada cerosa constitui uma barreira importante à perda de água, impedindo o emurchecimento do fruto. A baga apresenta ainda uma cicatriz, diametralmente oposta ao ápice, de dimensão e formato variáveis, segundo a espécie e cultivar (Sousa *et al.*, 2007).



Figura 6. Frutos de mirtilo.

Ao longo do tempo, o género *Vaccinium* evoluiu principalmente em climas temperados nomeadamente no norte do continente Americano, Europa e Ásia. A maior parte das atuais cultivares foram obtidas por hibridação de diferentes espécies

norte americanas, encontrando-se do ponto de vista hortícola, divididas em vários grupos.

Portugal, devido às suas condições edafo-climáticas, apresenta um elevado potencial para a cultura do mirtilo. Nos últimos anos assistiu-se a um aumento da área de produção, que passou de zero para cerca de quarenta e cinco hectares, com tendência para aumentar. O litoral Alentejano e a zona de Sever do Vouga são as principais regiões de produção de mirtilo (Sousa, 2007). O concelho de Sever do Vouga apresenta a maior área de produção de mirtilo a nível nacional, atividade que se tem revelado fundamental para a diversificação do sector agrícola e para a dinamização da economia local, tornando-se uma verdadeira alternativa à agricultura tradicional e uma importante fonte de rendimento para as famílias (Serrado *et al.*, 2008).

A produção de mirtilo pode decorrer durante os meses de Abril a Agosto combinando-se a cultura ao ar livre e a cultura protegida, desde que se proceda a uma escolha criteriosa de cultivares. Uma plantação de mirtilos entra em produção ao fim de 4 anos, sendo possíveis produções médias de cerca de 2 kg/planta (Sousa, 2007). Encontra-se em regiões nas quais o Inverno é rigoroso, dado que necessita em média de 700 a 1000 horas anuais de temperatura entre os 10 °C e os 12 °C (Serrado *et al.*, 2008).

O mirtilo apresenta, em média, cerca de 82 % de água. O conteúdo de água nos seus tecidos depende, entre outros fatores, da disponibilidade hídrica do solo na altura da colheita. Os açúcares são dos principais componentes solúveis presentes no mirtilo e representam cerca de 80 % da matéria seca. A glucose e a frutose são os principais açúcares existentes no mirtilo e os seus teores influenciam o sabor. É muito apreciado pelo seu sabor exótico, pelo seu valor comercial e pelas suas propriedades terapêuticas. Apresenta na sua composição uma variedade de vitaminas (A, B, C, K e ácido fólico), minerais (potássio, magnésio, cálcio, fósforo, ferro e manganês) e pectina (Spagolla *et al.*, 2009). Contém níveis consideráveis de compostos fenólicos, tais como antocianinas, taninos, flavonóides e procianidinas com alta atividade biológica (Koca *et al.*, 2009).

O mirtilo contém ácidos orgânicos em teores elevados, sendo os mais comuns o ácido cítrico e o ácido málico. O ácido quínico representa 40 % dos ácidos

orgânicos presentes, no mirtilo. O ácido málico apresenta valores entre 0,06 a 0,14 g/100 g de fruto maduro (Sousa *et al.*, 2007).

Este pequeno fruto contém um elevado teor de antioxidantes, e as suas quantidades chegam mesmo a ser superiores à de outros vegetais, tais como repolhos, espinafres e brócolos. Sendo ainda caracterizado como uma planta medicinal, podem-se usar quase todas as partes da planta, tais como flores, folhas, fruto e raízes. Pode ser consumido em fresco ou transformado em compota, gelado, licor, podendo até acompanhar pratos de carne especialmente caça ou ser usado em confeitaria (Serrado *et al.*, 2008).

5. OS COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são substâncias que existem principalmente nas plantas mas que podem também ser provenientes do catabolismo dos aminoácidos. A importância dada a estes compostos deve-se ao facto de muitos possuírem propriedades benéficas para a saúde humana (Marques, C. *et al.*, 2004). Segundo Halliwell *et al.* (1995), os compostos fenólicos podem atuar como antioxidantes por várias vias, nomeadamente pela eliminação de radicais livres, pela absorção de radicais de oxigénio e como quelantes de iões metálicos (Su *et al.*, 2007). Além disso, apresentam atividade farmacológica, inibem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos e participam nos processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma de vários alimentos (Soares, 2002).

Os compostos fenólicos são os antioxidantes mais abundantes na dieta humana, e o seu consumo diário pode atingir até 1 gr, o que é muito maior que o consumo de todos os outros fitoquímicos com propriedades benéficas (Ramirez, 2008).

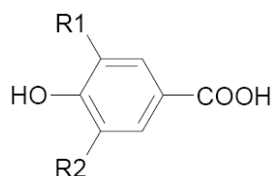
Diversos investigadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e utilização dos compostos fenólicos em alimentos, enfrentando muitos problemas metodológicos, pois, para além de englobarem uma gama enorme de substâncias (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos e ligninas), estes compostos são, na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos e suscetíveis à acção de enzimas (Soares, 2002).

A presença de compostos fenólicos nos frutos é uma constante, e uma boa parte dos compostos fenólicos utilizados na dieta humana são obtidos através do consumo destes alimentos (Gomes, 2003). A distribuição de compostos fenólicos na alimentação humana tem vindo a ser estudada de forma a verificar se os efeitos farmacológicos detetados *in vitro* podem ocorrer em sistemas biológicos. Apesar dos compostos fenólicos serem estruturalmente muito diversos e distribuídos por um número alargado de espécies vegetais, os elementos deste grupo presentes em quantidade significativa na dieta humana não são muito variados. As principais fontes de fenóis na dieta humana são os alimentos vegetais (cereais, frutas e legumes) e os seus derivados (sumos, vinho, cerveja e chá) (Gonçalves, 2007).

5.1. Compostos não-flavonóides

Os compostos não-flavonóides são um grupo vasto de compostos de onde se destacam os ácidos benzóicos, os ácidos cinâmicos, os estilbenos e as isoflavonas. Os ácidos benzóicos e cinâmicos (Figura 7), frequentemente denominados ácidos fenólicos, encontram-se nos frutos na forma livre em baixas concentrações quando comparados com as suas formas conjugadas. Estes compostos aparecem sobretudo sobre a forma de ésteres com ácido tartárico ou ligados a açúcares (Gonçalves, 2007). Caracterizam-se por terem um anel benzénico, um grupo carboxílico e um, ou mais, grupos hidroxilo e/ou metoxilo na molécula, conferindo propriedades antioxidantes, tanto para os alimentos, como para o organismo (Soares, 2002).

R ₁	R ₂	a) Ácidos benzóicos
H	H	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico
OH	H	Ácido protocatequínico
OH	OH	Ácido gálico
OCH ₃	H	Ácido vanílico
OCH ₃	OCH ₃	Ácido siríngico



R ₁	R ₂	b) Ácidos cinâmicos
H	H	Ácido <i>p</i> -cumárico
OH	H	Ácido cafeico
OCH ₃	H	Ácido ferrúlico
OCH ₃	OCH ₃	Ácido sinápico

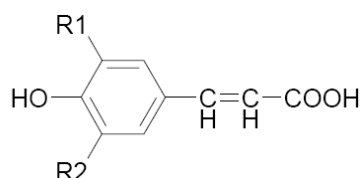


Figura 7. Estrutura química geral dos ácidos benzóicos e cinâmicos. Adaptado de Gonçalves (2007).

Segundo Russell *et al.* (2009) e relativamente aos frutos estudados neste trabalho, as Tabela 3 e Tabela 4 apresentadas mostram a quantidade de ácidos fenólicos (ácidos benzóicos e cinâmicos) livres e conjugados quantificados na framboesa e na groselha.

Tabela 3. Ácidos fenólicos (benzóicos e cinâmicos) livres presentes na framboesa e na groselha.

Ácidos fenólicos (livres)	Framboesa (mg/g)	Groselha (mg/g)
gálico	5.73 ± 0.53	1.27 ± 0.50
protocatequinas	3.83 ± 0.83	27.22 ± 2.13
<i>p</i> -hidroxibenzóico	33.31 ± 6.54	não observado
gentísico	não observado	2.01 ± 0.40
cafeico	2.33 ± 0.62	13.23 ± 1.45
vanílico	24.58 ± 6.32	não observado
siríngico	107.51 ± 47.28	não observado
<i>p</i> -cumárico	não observado	não observado
ferrúlico	74.33 ± 17.20	não observado
sinápico	36.89 ± 10.01	não observado
salicílico	7.64 ± 4.77	não observado

Adaptado de Russell *et al.* (2009).

Tabela 4. Ácidos fenólicos (benzóicos e cinâmicos) conjugados presentes na framboesa e na groselha.

Ácidos fenólicos (conjugados)	Framboesa (mg/g)	Groselha (mg/g)
gálico	1669.25 ± 256.24	43.59 ± 15.63
protocatequinas	273.26 ± 68.81	389.80 ± 100.82
<i>p</i> -hidroxibenzóico	676.31 ± 76.59	120.75 ± 19.75
gentísico	não observado	41.28 ± 6.30
cafeico	63.95 ± 8.05	354.51 ± 60.82
vanílico	94.34 ± 26.65	48.21 ± 6.07
siríngico	5.91 ± 3.07	não observado
<i>p</i> -cumárico	224.64 ± 37.62	504.81 ± 62.83
ferrúlico	127.74 ± 12.85	67.27 ± 5.37
sinápico	42.89 ± 9.33	não observado
salicílico	25.13 ± 5.57	não observado

Adaptado de Russell *et al.* (2009).

Os estilbenos são 1,2 –diariletanos (Figura 8). O anel A geralmente possui dois grupos hidroxilo na posição *meta*, enquanto o anel B está substituído por grupos hidroxilo e metoxilo nas posições *orto*, *meta* e/ou *para*. O membro mais abundante desta família é o resveratrol (Gonçalves, 2007).

R ₂	R ₃	R ₄	Estilbenos
H	H	H	pinosilvina
H	H	OH	resveratrol
OH	H	OH	hidroxiresveratrol
H	OH	OH	piceatanol
H	OH	OCH ₃	rapontigenina

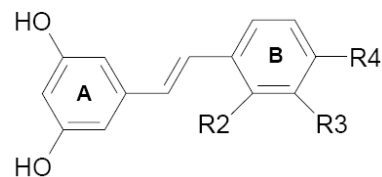


Figura 8. Estrutura geral dos estilbenos. Adaptado de Gonçalves (2007).

As isoflavonas são um grupo importante de compostos fenólicos que se encontram presentes sobretudo nas leguminosas e nas favaceas como seja o caso da soja. A sua base estrutural é o 1,2 – diarilpropano (Figura 9). A sua propriedade biológica mais relevante é a semelhança com a hormona de mamíferos, o estrogénio, tendo por isso, relevância farmacológica (Cassidy *et. al.*, 2000).

R ₁	R ₂	Isoflavona
H	H	daidzeína
OH	H	genisteína
H	OCH ₃	gliciteína

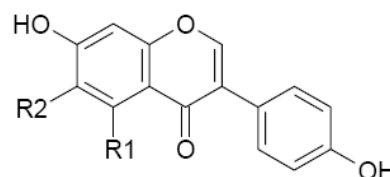


Figura 9. Estrutura geral das isoflavonas. Adaptado de Gonçalves (2007).

5.2. Compostos flavonóides

O grupo de compostos fenólicos mais relevante nos alimentos é o dos flavonóides. A este grupo pertence um número alargado de famílias de compostos como seja, os flavanóis, os flavonóis, as flavanonas, as flavonas, as antocianinas e os taninos que diferem no seu padrão de oxidação (Gonçalves, 2007).

Os flavonóides são caracterizados pela estrutura C₆-C₃-C₆ com dois anéis fenólicos (A e B) e um anel heterocíclico pirânico (C) que os une. A Figura 10 apresenta a estrutura geral do núcleo flavânico da qual se constituem os flavonóides.

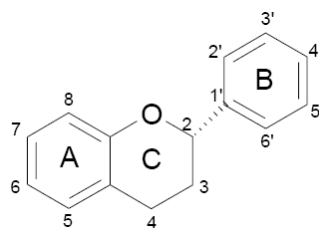


Figura 10. Estrutura química do núcleo flavânico. Adaptado de Gonçalves (2007).

a) Antocianinas

As antocianinas são um grupo de compostos que apresentam um papel importante na cor dos frutos e cuja estrutura deriva de glucósidos do catião flavílio com diferentes graus de hidroxilação e metoxilação. Na sua forma não glicosilada denominam-se de antocianidinas (agliconas).

A diversidade estrutural das antocianidinas (agliconas) depende do número e posição dos grupos hidroxilo e metoxilo ligados aos anéis aromáticos (A e B). Estas substituições interferem na cor apresentada por cada uma das antocianidinas e condicionam a sua aplicação como corantes na indústria alimentar (Gonçalves, 2007).

Enquanto a hidroxilação conduz ao aumento da tonalidade azul, a metoxilação tem o efeito oposto, enaltecendo a tonalidade vermelha. Por outro lado, as antocianinas metoxiladas são mais estáveis que as hidroxiladas, uma vez que as moléculas orto-hidroxiladas são transformadas mais facilmente em quinonas (Bourzeix, 1976). A um determinado pH as antocianinas-3-glucósido são mais coradas que as antocianinas-3,5-diglucósido. Da mesma forma as antocianinas podem ser coradas ou não consoante o pH do meio, a sua concentração e a presença ou não de co-pigmentação (Mazza e Brouillard, 1987).

As interacções moleculares das antocianinas com outros compostos afectam a sua estabilidade, contribuindo desta forma para a enorme variedade de cores que estes pigmentos exibem (Heredia *et al.*, 1998). A este fenómeno dá-se o nome de co-pigmentação. Neste fenómeno ocorre uma interacção molecular através de ligações de hidrogénio e interacções hidrofóbicas entre as antocianinas e outras moléculas (não coradas) que actuam como co-pigmentos (Davies & Mazza, 1993).

Os co-pigmentos encontrados pertencem a diversas famílias de compostos tais como flavonóides (em particular os flavanóis), ácido fenólicos, alcaloides, aminoácidos e ácidos orgânicos.

Estruturalmente, a co-pigmentação é a associação hidrofóbica entre cromóforos de moléculas de glucósidos das antocianinas com a parte plana eletronicamente insaturada de co-pigmentos, que podem ser flavonóides incolores e em particular derivados subgrupos dos flavanóis e das flavonas ou outros compostos fenólicos, tais como certos ácidos fenólicos. O equilíbrio de co-pigmentação pode ser descrito como uma reação em que antocianinas livres se juntam a cofactores de co-pigmentação que vão co pigmentando as antocianinas e vice-versa (Corte-Real, 2009).

A co-pigmentação desempenha um importante efeito foto-protector das antocianinas (Spranger-Garcia, 1990), ou seja, impede que estas se degradam rapidamente devido às reacções de oxidação que estas sofreriam caso não fizessem parte dos complexos de co-pigmentação. Representa um papel importante na estabilidade dos pigmentos monoméricos e determina a quantidade potencial de pigmentos poliméricos (Boulton, 2000).

A co-pigmentação antociânica resulta em cores mais brilhantes, fortes e estáveis do que as expressas pelas antocianinas não co pigmentadas (Eiro et al., 2002).

As antocianinas encontram-se amplamente distribuídas em frutas e legumes. São uma das principais classes dos flavonóides e contribuem significativamente para a atividade antioxidante dos flavonóides. Como captadores de radicais livres, podem potencialmente interagir com sistemas biológicos, inibindo ações prejudiciais ao organismo, nomeadamente na proteção antibacteriana e cardiovascular (Su *et al.*, 2007). Caracterizam-se também por possuírem efeito anticancerígeno, anti-inflamatório, bem como, efeito neuroprotetor (Bakowska-Barczak *et al.*, 2011). São também responsáveis pela cor intensa avermelhada, azul ou arroxeadas dos pequenos frutos (Su *et al.*, 2007).

As antocianinas (Figura 11) podem diferir na natureza pelo número e posição dos açúcares (pentoses, metilpentoses e hexoses) ligados à molécula e pela esterificação do açúcar com ácidos fenólicos. Na maioria dos casos os açúcares ligam-se na posição 3 podendo também ocorrer ligações na posição 5 e 7.

Os açúcares podem ser mono-, di- e trissacáridos. Graças à diversidade de padrões de glucosilação e acilação, existem cerca de 300 antocianinas identificadas na natureza (Goffon *et al.* 1991).

R ₁	R ₂	Antocianina	Cor
H	H	pelargonidina-3-glucósido	vermelha alaranjada
OH	H	cianidina-3-glucósido	vermelha
OH	OH	delfinidina-3-glucósido	rosa
OCH ₃	H	peonidina-3-glucósido	roxa azulada
OCH ₃	OH	petunidina-3-glucósido	roxa
OCH ₃	OCH ₃	malvidina-3-glucósido	roxa avermelhada

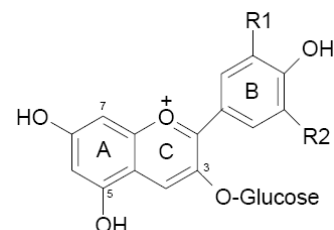


Figura 11. Estrutura de antocianidinas 3-glucósido. Adaptado de Gonçalves (2007).

A seguir, na Tabela 5 destacam-se as principais antocianinas existentes nos frutos vermelhos.

Tabela 5. Principais antocianinas presentes nos frutos vermelhos.

Principais antocianinas presentes nos frutos vermelhos		
Framboesa	Groselha	Mirtilo
cianidina-3-glucósido	cianidina-3-glucósido	cianidina-3-glucósido
cianidina-3-rutinósido	cianidina-3-rutinósido	cianidina-3-galactósido
cianidina-3-suforósido	cianidina-3-suforósido	cianidina-3-arabinósido
cianidina-3,5-diglucósido		delfinidina-3-glucósido
pelargonidina-3-glucósido		delfinidina-3-galactósido
pelargonidina-3-rutinósido		delfinidina-3-arabinósido
pelargonidina-3-suforósido		malvidina-3-glucósido
quercetina-3-glucósido		malvidina-3-galactósido
quercetina-3-acetilglucósido		malvidina-3-arabinósido
quercetina-3-rutinósido		peonidina-3-glucósido
		peonidina-3-galactósido
		peonidina-3-arabinósido
		petunidina-3-galactósido
		quercetina-3-glucósido

Adaptado de Del Rio *et al.* (2010).

b) Taninos

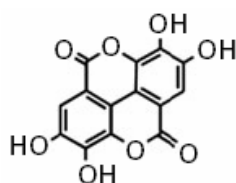
Taninos são compostos hidrossolúveis com pesos moleculares entre 500 e alguns milhares de *Dalton*, que para além das reacções normais das moléculas fenólicas, apresentam a capacidade para reagir com alcaloides, gelatina e outras proteínas formando precipitados. Este grupo de compostos que precipitam com as proteínas pode ser dividido em *taninos hidrolisáveis* e *taninos condensados* (procianidinas) (Gonçalves, 2007).

Estes compostos possuem acção antisséptica (antibacteriana e antifúngica) favorecendo a regeneração dos tecidos no caso de feridas ou queimaduras (Fernandes, 2010).

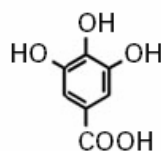
i) Taninos hidrolisáveis

Este grupo de compostos tem como base um ácido fenólico, o ácido gálico (taninos gálicos) e o ácido elágico (taninos elágicos) (Figura 12) ligados a uma molécula de açúcar. Na maior parte dos casos, estes encontram-se na natureza sobre a forma de ésteres múltiplos com açúcares, nomeadamente a *D-glucose* formando estruturas complexas. Esta molécula é a base da biossíntese dos taninos hidrolisáveis mais complexos como é o ácido tânico encontrado em partes não comestíveis de plantas (Gonçalves, 2007).

Segundo Daniel *et al.*, citado por Gonçalves (2007), um estudo realizado com as partes comestíveis de diversos frutos, permitiu concluir que apenas em morangos, framboesas e mirtilos existiam taninos elágicos detetáveis por HPLC-UV. As quantidades detetadas situaram-se entre 0,5 e 10mg/g de fruto fresco.



Ácido elágico



Ácido gálico

Figura 12. Estrutura química do ácido elágico e do ácido gálico.

Adaptado de Del Rio *et al.*, (2010).

ii) Taninos condensados – flavanóis

Os taninos condensados também designados como procianidinas são polímeros constituídos por duas ou mais unidades de flavan-3-óis, tal como demonstra a Figura 13. Existem na natureza hidroxilados nas posições 5 e 7 do anel A, variando na estereoquímica do carbono 3 do anel C e no grau de hidroxilação do anel B.

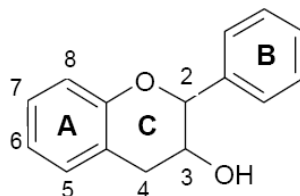


Figura 13. Estrutura química geral dos flavan-3-óis.

Os compostos mais simples da família dos flavanóis são as epicatequinas e as catequinas (monómeros) (Del Rio *et al.*, 2010). De seguida, a Figura 14 apresenta a estrutura química geral destes compostos, bem como de outros da respetiva família presentes nos frutos em estudo.

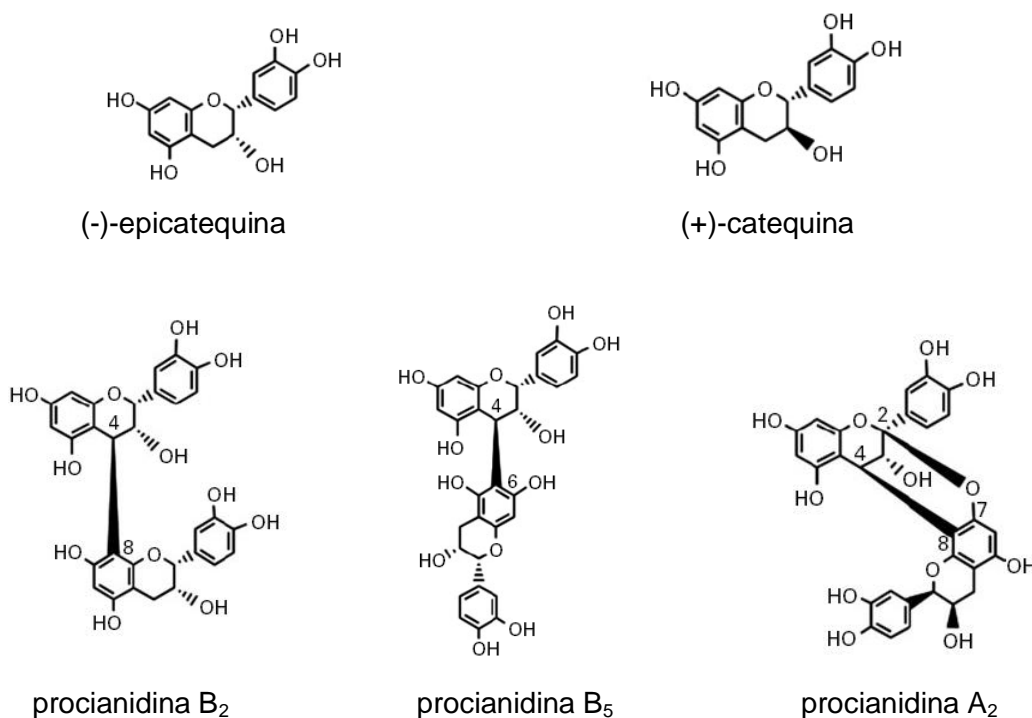


Figura 14. Estrutura química dos flavan-3-óis monómeros e de alguns dímeros identificados nos frutos. Adaptado de Del Rio *et al.*, (2010).

A quantidade de taninos condensados ingeridos corresponde a mais de metade do total de compostos fenólicos ingeridos diariamente. Esta ingestão deve-se à sua grande abundância em vegetais e frutas (Gonçalves, 2007). De seguida, apresenta-se a Tabela 6 que evidencia a concentração destes compostos, nas suas variadas formas, nos frutos vermelhos.

Tabela 6. Concentrações de flavan-3-óis monómeros, dímeros, trímeros e procianidinas totais existentes nos frutos vermelhos (mg/kg fresco).

Fruto	monómeros	dímeros	trímeros	Procianidinas totais
framboesa	44 ± 34	115 ± 100	57 ± 5,7	302 ± 230
groselha	13	20	15	608
mirtilo	40 ± 15	72 ± 18	54 ± 12	1798 ± 508

Adaptado de Del Rio *et al.*, (2010).

6. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

O processo respiratório e diversas reacções oxidativas, que ocorrem nas células aeróbias, levam à formação de radicais livres que causam danos ao organismo e contribuem para o aparecimento de muitas doenças (inflamações diversas, tipos de cancro, doença de Alzheimer e doenças cardiovasculares), bem como, aceleram o processo de envelhecimento. Por isso, as células humanas dependem de alguma capacidade antioxidante para fornecer protecção contra os efeitos prejudiciais dos radicais livres e de espécies reativas de oxigénio, que são consequências inevitáveis da vida aeróbia.

Para alcançar uma protecção eficiente, os tecidos dispõem de um sistema antioxidante integrado, que consiste num arranjo de diversos componentes lipossolúveis (vitamina E, carotenoides), hidrossolúveis (ácido ascórbico, glutatona) e enzimáticos (glutatona peroxidase, superóxido dismutase, catalase) (Silva *et al.*, 2010).

Existem estudos que referenciam a atividade antioxidante de extratos de frutas, analisados por diversos métodos, a fim de correlacionar o consumo de alimentos vegetais e os efeitos benéficos à saúde.

Embora seja difícil analisar a relação entre o consumo de vegetais a partir da dieta e o risco de mortalidade, estudos realizados por Rissanen *et al.* (2003) verificaram uma relação inversa entre o consumo de alimentos vegetais (> 408 g/dia) e a incidência de doenças cardiovasculares. Esta mesma relação foi também observada por Johnsen *et al.* (2003) para a taxa de risco de derrame (54506 indivíduos, 50-64 anos) (Hassimotto, 2005). Estes efeitos têm sido particularmente atribuídos aos compostos que possuem atividade antioxidante (Silva *et al.*, 2010).

6.1. Antioxidantes

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que quando presentes nos alimentos a determinadas concentrações retardam ou inibem a oxidação de substratos oxidáveis. Também desempenham um papel fundamental na defesa do organismo contra os radicais livres e substâncias altamente reativas com o oxigénio (Pereira, 2010).

Os principais antioxidantes nos vegetais são as vitaminas C e E, os carotenoides e os compostos fenólicos, especialmente os flavonóides (Silva *et al.*, 2010).

As substâncias antioxidantes podem apresentar diferentes propriedades protetoras e agir em diversas etapas do processo oxidativo, funcionando por diferentes mecanismos e são, portanto, classificadas em duas categorias principais: antioxidantes primários e antioxidantes secundários.

Os antioxidantes primários são compostos de acção antioxidante, capazes de inibir ou retardar a oxidação por inativação de radicais livres graças à doação de átomos de hidrogénio ou de electrões, o que transforma os radicais em substâncias estáveis.

Os antioxidantes secundários podem apresentar uma grande variedade de mecanismos de acção, como por exemplo, a ligação de iões metálicos (alteração de valência), a inativação das espécies reativas de oxigénio, a conversão de hidroperóxidos em espécies não-radicalares ou a absorção de radiação ultravioleta (Silva *et al.*, 2010).

De acordo com vários autores (Pokorný *et al.*, 1991 e Pereira, 2010), os antioxidantes podem ser agrupados segundo os seus mecanismos de acção (Tabela 7).

Tabela 7. Mecanismos de acção dos antioxidantes.

Tipo de Antioxidante	Mecanismos de Acção	Compostos
Antioxidante	Inativam os radicais livres lipídicos	Compostos fenólicos
Estabilizadores de Hidroperóxidos	Previnem a decomposição de hidroperóxidos em radicais livres	Compostos fenólicos
Sinergistas	Promovem a atividade dos antioxidantes	Ácido cítrico, ácido ascórbico
Inativadores metálicos	Ligam metais pesados tornando-os inativos	Ácido fosfórico, compostos de Maillard, ácido cítrico
Desactivadores de oxigénio singuleto	Transformam o oxigénio singuleto em oxigénio tripleto	Carotenóides
Substâncias que reduzem hidroperóxido	Reduzem hidroperóxidos por vias não radicais	Proteínas e aminoácidos

Adaptado de Pereira (2010)

Os antioxidantes estão presentes em praticamente todas as plantas, microrganismos e tecidos animais. Na sua maioria são compostos fenólicos, entre os quais, tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos.

O mecanismo de acção antioxidante dos fenóis está relacionado com a facilidade de ceder um átomo de hidrogénio aos radicais lipídicos e assim quebrar as reacções de propagação durante a oxidação. O radical fenólico formado é mais estável e menos reativo. Os dois grupos hidroxilo na vizinhança e o grupo carbonilo na forma de éster aromático (lactona, flavanona ou flavona) são fatores essenciais para a atividade antioxidante (Pereira, 2010).

Uma dieta adequada que envolva o consumo de antioxidantes, pode minimizar o risco de certos tipos de doença. Alguns autores sugerem também a ocorrência de efeitos aditivos e sinérgicos por parte dos fitoquímicos presentes em frutos e vegetais, e que levam a uma considerável atividade antioxidante e anticancerígena (Ferreira e Abreu, 2007). Os antioxidantes da dieta podem proteger o organismo humano contra danos no ADN celular, lípidos e proteínas, infligidos por radicais livres, por terem capacidade de inibir oxido-redutases. Os compostos fenólicos podem quelatar iões metálicos pró-oxidantes (como Fe^{2+} / Fe^{3+} e Cu^{2+}), prevenindo a formação de radicais livres a partir desses elementos (Sousa, 2008).

6.2. Radicais Livres

Um radical livre pode ser um átomo ou uma molécula que contém um ou mais eletrões desemparelhados, isto é, tem orbitais com apenas um eletrão. Sob esta forma, o composto apresenta uma forte reatividade com a maioria das espécies químicas. Os radicais livres derivados de oxigénio são genericamente conhecidos como *espécies reativas de oxigénio* e representam a classe mais importante de radicais livres geradas pelo organismo. Assim, apesar do oxigénio molecular (O_2) ser essencial para a vida aeróbia, pode ser tóxico em determinadas condições (Ferreira e Abreu, 2007). Segundo Sousa (2008), o organismo utiliza cerca de 98 a 99% do oxigénio que consome para produzir energia. A restante percentagem não participa no processo, mas sim na formação destas espécies tóxicas reativas. A este fenómeno chamamos o “*paradoxo do oxigénio*” (Ferreira e Abreu, 2007).

A maioria dos danos causados pelos radicais livres pode ser restaurada por sistemas de reparação internos, contudo, existem radicais que permanecem no organismo por este não ter forma de os poder eliminar (Sousa, 2008).

As mitocôndrias são uma das principais fontes de espécies reativas de oxigênio, mas são também, um dos primeiros alvos de ataque destes radicais. Uma vez que a cadeia respiratória é composta por proteínas transmembranares que existem na membrana mitocondrial interna, a formação destas espécies ocorre perto da membrana. Assim, têm fácil acesso aos lípidos desta membrana, que são especialmente sensíveis a fenômenos de ataques de radicais livres, tal como ilustra a Figura 15 (Fernandes, 2010).

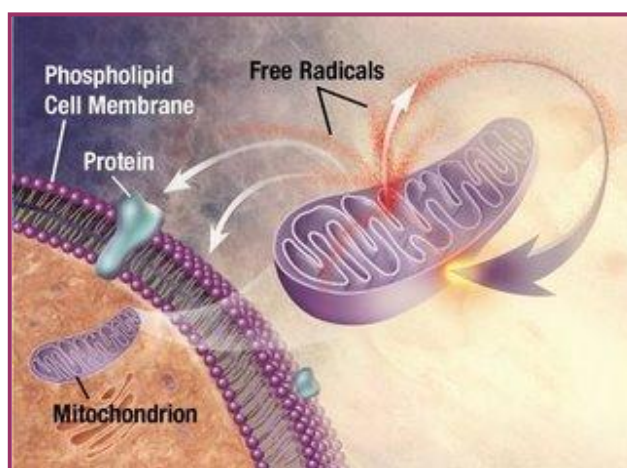


Figura 15. Ataque de radicais livres através das mitocôndrias.

A exposição do organismo a radicais livres, provenientes de diversas fontes, levou o organismo a desenvolver uma série de mecanismos de defesa para eliminar estes radicais livres. Estas defesas foram a resposta da evolução à inevitabilidade da existência de radicais de oxigênio em condições de vida aeróbia. Estas defesas podem ser enzimáticas ou não enzimáticas (Ferreira e Abreu, 2007).

As defesas antioxidantes enzimáticas são em grande número e encontram-se espalhadas por todo o organismo, tanto no meio intracelular como no meio extracelular. Exemplos destas defesas são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutatona peroxidase (GPH-Px), a glutatona redutase (GPHR), entre outras (Figura 16).

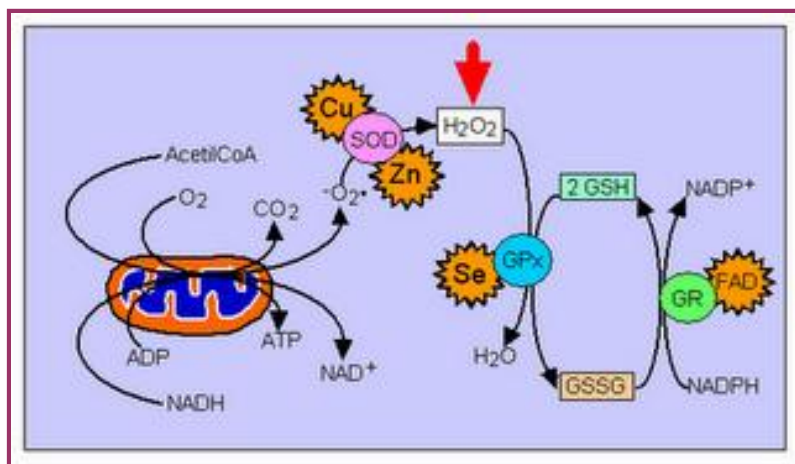


Figura 16. Defesas antioxidantes enzimáticas.

Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas, Figura 17, destacam-se os compostos como a glutatona (GSH), o α -tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), o ácido lipóico, os carotenoides, os flavonóides, entre outros.

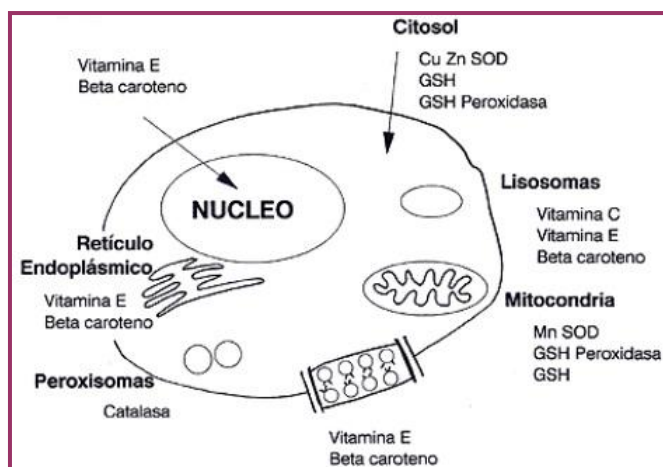


Figura 17. Defesas antioxidantes não enzimáticas.

Mas, para além das defesas endógenas, existe uma gama variada de moléculas naturais ou sintéticas com propriedades antioxidantes e que podem constituir um sistema exógeno de defesa. Produtos naturais com atividade antioxidante podem ser úteis no auxílio do sistema protector endógeno, podendo ser utilizados como nutracêuticos. Nessa perspetiva, os antioxidantes presentes na nossa dieta assumem uma grande importância como possíveis agentes protetores que ajudam o corpo humano na redução dos danos oxidativos.

6.3. Stress Oxidativo

As plantas, durante o seu ciclo de vida, estão expostas a diversas situações desfavoráveis, que se traduzem por desequilíbrios ou stresses, ao nível do seu desenvolvimento e crescimento, e que portanto, afectam a produtividade. Neste contexto, um stress representa uma alteração significativa das condições favoráveis ao crescimento e desenvolvimento normal de um organismo, o que origina uma resposta, a diferentes níveis, que passam por alterações fisiológicas, bioquímicas, moleculares e ainda na expressão de genes (Baptista, 2009).

Em organismos aeróbios, os radicais livres são constantemente produzidos durante o funcionamento normal da célula, na maior parte sob a forma de espécies reativas de oxigénio. Uma vez produzidos, a maior parte dos radicais livres são removidos pelas defesas antioxidantes da célula que incluem enzimas e moléculas não enzimáticas. A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo.

Em concentrações baixas ou moderadas, as espécies reativas de oxigénio podem ser benéficas para a célula, estando envolvidas em vários processos fisiológicos. No entanto, há situações em que o equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigénio e as defesas antioxidantes pode ser destruído devido a uma produção excessiva dessas espécies, ou porque existe um défice nas defesas antioxidante da célula.

A este desequilíbrio denomina-se de stress oxidativo, e nessas situações, as espécies reativas de oxigénio em excesso podem oxidar e danificar lípidos, proteínas e DNA, levando à sua modificação e frequentemente à sua inutilização, inibindo a sua função normal.

O stress oxidativo pode ter causas naturais, como o que ocorre em situações de exercício físico extremo, ou em processos de inflamação; mas pode também ter causas não naturais como a presença de xenobióticos no organismo ou em situações relacionadas com várias doenças. De facto, a produção não controlada de radicais livres foi já associada como causa, ou como estando relacionada com muitas doenças incluindo: vários tipos de cancro, diabetes, cirrose, doenças cardiovasculares e desordens do foro neurológico, entre outras. A sobreprodução de

espécies reativas de oxigénio tem sido inclusivamente relacionada com o processo de envelhecimento.

Considerando a estimativa de que 70 % das doenças crónicas e dos custos associados podem ser prevenidos, facilmente se compreende a primordial importância do conhecimento, e se possível, do controle da produção excessiva de espécies reativas de oxigénio. Este controle pode ser obtido assegurando níveis adequados de antioxidantes e quelantes de radicais livres; quer melhorando a qualidade da dieta (maior consumo de vegetais, leguminosas e frutos), quer evitando comportamentos conducentes a uma maior produção de radicais livres e espécies reativas de oxigénio, como o tabaco e a exposição excessiva a poluentes ambientais e xenobióticos (Ferreira e Abreu, 2007). A Figura 18 ilustra bem a situação de causa/efeito da acção dos radicais livres no organismo humano.

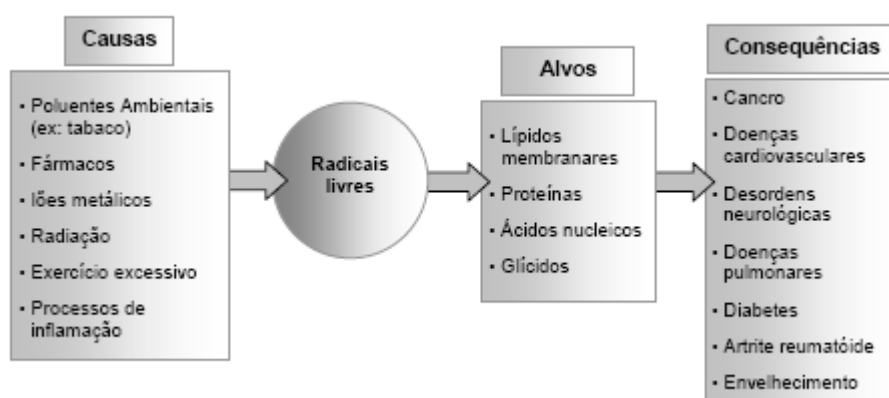


Figura 18. Principais causas e consequências da acção dos radicais livres. Adaptado de Ferreira e Abreu (2007).

6.4. Avaliação da Capacidade Antioxidante – DPPH/ABTS

A captação de radicais é o principal mecanismo de acção dos antioxidantes nos alimentos (Pereira, 2010). Existem diversas metodologias para avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante em produtos alimentares e fármacos recorrendo a diversos sistemas químicos (Antolovich *et al.*, 2002). A utilização de espécies radicalares com máximo de absorção na zona do visível, tais como o radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Figura 19) ou o radical gerado a partir do ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS) (Figura 20), constituem a base de

duas das metodologias *in vitro* usadas com frequência em ensaios preliminares, anteriores à separação e caracterização de compostos bioativos.

O radical 2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) é estável e é caracterizado por um máximo de absorvância próximo dos 515 nm. Na presença de uma substância capaz de lhe doar um átomo de hidrogênio, o DPPH transforma-se na sua forma reduzida (DPPH-H), perdendo a cor violeta da solução original, que se traduz na diminuição da absorvância a 515 nm (Figura 21) (Magalhães *et al.*, 2005).

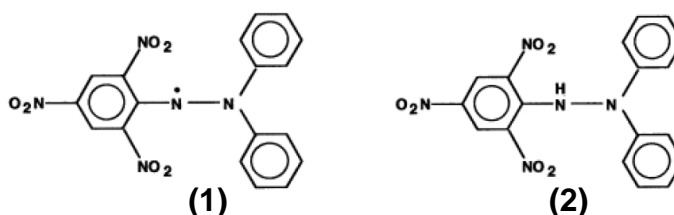


Figura 19. Radical 2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (1) e na sua forma reduzida (2).

O método de ABTS baseia-se na geração de um catião radicalar ($ABTS^{*+}$) através da reação entre o ABTS e o persulfato de potássio originando uma solução azul-esverdeada com capacidade de absorver a 734 nm. A adição de substâncias com poder antioxidante ao ($ABTS^{*+}$) provoca uma alteração estrutural que se traduz na descoloração e perda da capacidade de absorver nesse comprimento de onda (Magalhães *et al.*, 2005).

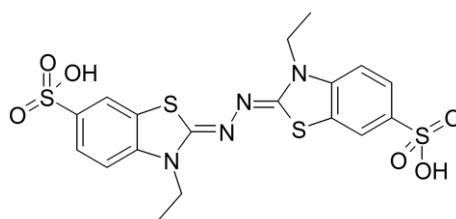


Figura 20. Radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína)-6-sulfônico (ABTS)

Apesar da facilidade e simplicidade com que estas metodologias são executadas, o controlo rigoroso das condições reacionais é fundamental para a obtenção de resultados fiáveis (Magalhães *et al.*, 2005).

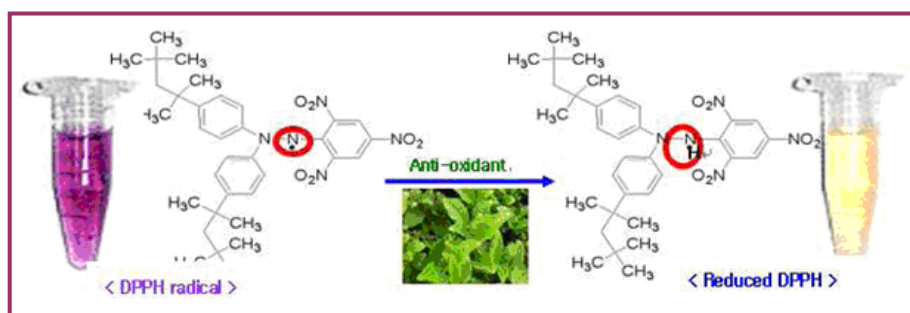


Figura 21. Exemplo de mudança de cor do radical DPPH após reagir com antioxidante. Adaptado de Pereira (2010).

Na maioria dos casos, o método de DPPH é utilizado para medir a captação de radicais após 30 minutos depois de iniciada a reação. Normalmente, é expresso em valor EC_{50} , ou seja, a concentração de antioxidante necessária para captar 50% dos radicais de DPPH num período de tempo determinado.

O DPPH é um radical estável e com baixa taxa de deterioração e reatividade com a maioria dos compostos. Assim sendo, apenas reagentes redutores fortes são capazes de reagir com estes radicais estáveis num modo estequiométrico. A baixa absorvância obtida indica que ocorreu atividade sequestradora de radicais livres (Borges *et al.*, 2011).

O radical catiónico ABTS é mais reativo que o radical DPPH, logo, a reação ocorre completamente após 1 minuto. A atividade de captação de radicais pelo método de ABTS expressa-se em valor TEAC (*trolox equivalent antioxidant capacity* (capacidade antioxidante equivalente *trolox*)).

Uma utilidade deste método é a possibilidade de medir a actividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica.

Em suma, estes dois métodos colorimétricos são relativamente simples e não necessitam de temperaturas altas para a sua execução (Borges *et al.*, 2011). Podem ser úteis para a busca de novos antioxidantes mas não quando se pretende valorizar a utilidade de um antioxidante num alimento, já que a sua atividade neste caso, depende de fatores tais como a polaridade, a solubilidade e a atividade quelante dos metais (Pereira, 2010).

III. MATERIAL E MÉTODOS



7. AMOSTRAS

Para este trabalho foram recolhidas amostras de framboesa, groselha e mirtilo produzidas em modo de produção biológica na Empresa Vasco Pinto & Agostinho Sousa, Lda., sediada na freguesia de Vila Maior, no concelho de São Pedro do Sul, distrito de Viseu.

A Empresa Vasco Pinto & Agostinho Sousa, Lda. (Figura 22) é uma empresa certificada, criada em 1999 que produz, transforma e distribui produtos agrícolas biológicos.



Figura 22. Imagens da Empresa Vasco Pinto & Agostinho Sousa, Lda.

As amostras foram colhidas entre o dia 3 de junho e o dia 9 de julho do ano de 2010, altura que atingem o seu ponto de maturação ótimo. A Tabela 8 identifica o código atribuído às amostras em função da data de colheita.

Tabela 8. Identificação das amostras recolhidas.

Data de colheita	03/06/2011	10/06/2011	17/06/2011	24/06/2011	01/07/2011	09/07/2011
Framboesa	F0306	F1006	F1706	F2406	F0107	F0907
Groselha	G0306	G1006	G1706	G2406	G0107	G0907
Mirtilo	M0306	M1006	M1706	M2406	M0107	M0907

8. MÉTODOS UTILIZADOS

8.1. Método de Extração dos Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos presentes nos frutos foram extraídos segundo adaptação do método proposto por Ferreira *et al.* (2002). A Tabela 9 evidencia as condições específicas do método utilizado.

Tabela 9. Condições de extração do método utilizado.

Solventes utilizados	Proporção (v:v)	Tempo extração	Quantidade de fruto
metanol/ácido acético	98:2	1 hora (3x)	10 g
acetona/água	60:40	1 hora (3x)	10 g

Modo operatório

Pesaram-se 10 g de amostra e maceraram-se num copo de precipitação durante 5 minutos. Adicionaram-se 50 mL de solução de metanol:ácido acético (98:2) e mantiveram-se em agitação magnética, durante 1 hora, à temperatura ambiente (Figura 23).



Figura 23. Ilustração da extração dos compostos fenólicos das amostras.

A mistura foi filtrada e o sobrenadante colocado num porta-amostras. Este procedimento de extração foi repetido 3 vezes. O total de sobrenadantes foi colocado no mesmo porta-amostras e designado como extrato de metanol.

Seguidamente realizaram-se 3 extrações com uma solução de acetona:água (60:40) de forma semelhante à descrita acima. O conjunto destes sobrenadantes foi designado como extrato de acetona.

8.2. Quantificação dos Compostos Fenólicos Totais

Uma das formas de se poder avaliar o teor de compostos fenólicos totais é através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Estes compostos interagem com o reagente de Folin-Ciocalteu através dos seus grupos hidroxilo oxidáveis, resultando uma coloração cuja intensidade é medida espectrofotometricamente e a sua concentração é determinada através de retas de calibração (Marques *et al.*, 2004).

No presente trabalho procedeu-se à quantificação dos compostos fenólicos totais através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, adaptado de Singleton e Rossi (1965).

Método colorimétrico de Folin-Ciocalteu

Num tubo juntaram-se 750 µL de água destilada, 125 µL de amostra e 125 µL do reagente Folin-Ciocalteu. Aguardaram-se 6 minutos e adicionaram-se 2 ml de solução de carbonato de sódio a 5% (m/v). Em seguida colocaram-se as amostras no escuro, à temperatura ambiente, durante 90 minutos. Por fim procedeu-se à leitura das amostras num espectrofotómetro ao comprimento de onda de 760 nm. A análise foi feita em triplicado nos extratos de metanol e de acetona.

Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG).

8.3. Fracionamento dos Compostos Fenólicos

No sentido de avaliar a contribuição relativa de cada família de compostos fenólicos, estes foram fracionados por cromatografia em fase sólida. O processo de fracionamento dos compostos fenólicos totais dos frutos estudados foi efetuado por adaptação da metodologia descrita por Sun *et al.* (2006).

Para o processo de fracionamento dos compostos fenólicos foram utilizadas mini-colunas Discovery DSC-18, com capacidade de 60 mL e com 10 gramas de material de preenchimento C₁₈. As colunas foram ativadas com 60 mL de metanol e

em seguida lavadas com 120 mL de água destilada, seguindo-se um pré-condicionamento com 60 mL de solução tampão comercial de fosfato de pH 7,0 antes da sua utilização. O pH da amostra foi neutralizado por adição de NaOH.

A amostra foi cuidadosamente carregada na coluna C-18 preconditionada, com um fluxo de menos de 2 mL/min. A Figura 24 ilustra o procedimento efetuado.

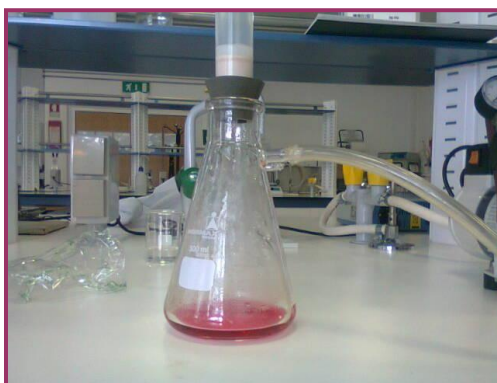


Figura 24. Fracionamento das amostras por colunas apolares de C₁₈.

O fracionamento começou adicionando 100 mL de solução tampão fosfato pH 7,0 (1:8 v/v) para eluir os ácidos fenólicos (fração tampão). De seguida, a coluna foi lavada com 50 mL de água destilada e seca sob vácuo por alguns segundos. A eluição com 100 mL de acetato de etilo permitiu isolar a fração constituída por monómeros e oligómeros das procianidinas. Os compostos fenólicos fixados na coluna, compostos por antocianinas e pigmentos poliméricos foram eluídos finalmente com 100 mL de metanol acidificado com 0,1% de HCl (extrato metanol).

A fração tampão foi utilizada para a determinação dos ácidos fenólicos e a extração metanol foi usada para a determinação das antocianinas monoméricas, recorrendo-se à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

8.4. Quantificação dos Taninos Totais

A quantificação dos taninos totais nos frutos em estudo foi efetuada pelo método de Cheynier *et al.* (1989).

Inicialmente preparou-se num balão de 500 mL, uma solução standard composta por 200 mL de HCl, 200 mL de butanol e 60 mg de sulfato de ferro hexahidratado. De seguida, foram retirados 100µl de amostra para um balão de

diluição de 5 mL e perpez-se o conteúdo com água destilada. Tapou-se e homogeneizou-se a solução, a qual foi identificada como solução A.

De seguida colocou-se num tubo de ensaio 2 mL da solução A e adicionaram-se 6 mL da solução standard, o qual foi tapado e agitado cuidadosamente. Dividiu-se o conteúdo em dois tubos de ensaio, com 4 mL cada e identificaram-se como tubo 1 e tubo 2. O tubo 1 foi colocado em banho fervente (100 °C) durante 30 minutos e arrefecido de seguida. O tubo 2 foi colocado no escuro, à temperatura ambiente, durante 30 minutos. Após isto, a absorvância das soluções (Abs₁ e Abs₂, respetivamente) foi determinada no espectrofotómetro a 540nm. A análise foi efetuada em triplicado.

A quantificação dos taninos totais em solução foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Taninos Totais (g/L)} = (\text{Abs}_2 - \text{Abs}_1) \times 0.1736 \times 50$$

Os resultados do teor em taninos totais dos frutos estudados foram expressos em mg/g de fruto fresco.

8.5. Quantificação das Antocianinas Totais

A quantificação das antocianinas totais foi determinada através do método de Boulton *et al.* (2001). Este método baseia-se na formação de um composto incolor por combinação das antocianinas com o ião HSO₃⁻.

Num copo colocou-se 1 mL de HCl, 70 ml de etanol e 30 ml de água destilada e homogeneizou-se a solução. De seguida, colocaram-se 100 µl de amostra num balão de diluição de 5 ml, perpez-se o conteúdo do balão com a solução anteriormente preparada e homogeneizou-se de seguida.

Procedeu-se à leitura da absorvância de 540 nm e a análise foi efetuada em triplicado.

Para o cálculo das antocianinas totais foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Antocianinas Totais (mg/L)} = \text{Abs}_{540} \times 16.17 \times 50$$

Os resultados do teor em antocianinas totais nos frutos estudados foram expressos em equivalentes de malvidina-3-glucósido por grama (EMvG/g) de fruto fresco.

8.6. Determinação da Percentagem de Polimerização das Antocianinas

A determinação da percentagem das várias formas de polimerização das antocianinas, ou seja, antocianinas monoméricas, poliméricas e co-pigmentadas, foi feita por adaptação ao método de Mazza *et al.* (1999).

Nesta metodologia foram efetuados três processos distintos com o objetivo de no final, se poder calcular a percentagem de distribuição das várias formas de antocianinas existentes.

No Processo 1 (A_{acet}), adicionaram-se 20 μL de solução de acetaldeído a 2 mL de amostra e seguido de repouso durante 45 minutos. Após isso, procedeu-se à leitura no espectrofotómetro, a uma absorvância de 520 nm.

No Processo 2 (A_{SO_2}), adicionaram-se 260 μL de solução sulfurosa a 2mL de amostra e procedeu-se, de seguida, à leitura no espectrofotómetro, a uma absorvância de 520 nm.

No Processo 3 (A_{extrat}), o valor da absorvância da solução de antocianinas foi determinado diretamente a 520 nm.

A percentagem de distribuição das várias formas de antocianinas existentes, foram calculadas através das seguintes fórmulas:

$$\% \text{ co-pigmentadas} = [(A_{\text{acet}} - A_{\text{extrat}}) / A_{\text{acet}}] \times 100$$

$$\% \text{ monoméricas} = [(A_{\text{extrat}} - A_{\text{SO}_2}) / A_{\text{acet}}] \times 100$$

$$\% \text{ poliméricas} = [A_{\text{SO}_2} / A_{\text{acet}}] \times 100$$

8.7. Identificação e quantificação das Antocianinas monoméricas

Para a determinação das antocianinas individuais dos frutos estudados, as amostras foram colocadas por injeção direta no HPLC, segundo a metodologia descrita por Dallas & Laureano (1994).

Para tal utilizou-se um equipamento Dionex Ultimate 3000 Chromatographic System (Sunnyvale, California, USA) (Figura 25) equipado com bomba quaternária

modelo GPL-3400 A, um injetor automático ACC-3000, um compartimento de colunas com termóstato (regulável até 35 °C) e um detetor UV/Vis modelo MWD-300. Foi utilizada uma coluna C18 Acclaim® 120 (250 x 4.6 mm, tamanho das partículas 5 µm) (Dionex, Sunnyvale, California, USA), protegida por uma pré coluna C₁₈ do mesmo material.



Figura 25. Sistema de cromatografia utilizado.

Os solventes utilizados foram: (A) ácido fórmico a 40 %, (B) acetonitrilo puro (C) e água bi-destilada, ambos de qualidade analítica para uso cromatográfico. A eluição decorreu com um fluxo de 0,7 mLmin⁻¹. O gradiente utilizado na análise cromatográfica é o apresentado na Tabela 10.

Tabela 10. Gradiente de eluição utilizado na análise das antocianinas individuais dos frutos analisados por HPLC.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Solvente C (%)
0	25.0	6.0	69.0
15	25.0	6.0	69.0
85	25.0	25.5	49.5
105	25.0	25.5	49.5
110	25.0	6.0	69.0
125	25.0	6.0	69.0

O volume de injeção foi de 20 µL de amostra, sendo a análise realizada a 25 °C. A detecção foi efetuada a 520 nm. As amostras foram previamente filtradas por um filtro de 0,45 µm de diâmetro.

O tratamento dos dados foi efetuado recorrendo-se ao software Chromeleon (versão 6.8) (Sunnyvale, Califórnia, EUA).

As antocianinas foram quantificadas utilizando uma curva de calibração previamente obtida com soluções padrão de malvidina-3-glucosido. Os picos cromatográficos das antocianinas foram identificados de acordo com os tempos de retenção e a ordem de eluição dos compostos apresentados por Dallas & Laureano (1994).

8.8. Identificação e quantificação dos Ácidos Fenólicos

Para a determinação dos ácidos fenólicos dos frutos, procedeu-se à análise da fração tampão dos frutos que continham os ácidos fenólicos.

O equipamento cromatográfico utilizado para a determinação dos ácidos fenólicos foi o mesmo anteriormente descrito para a quantificação das antocianinas individuais, assim como a coluna utilizada.

A fase móvel A foi uma solução aquosa de ácido fórmico a 5% (usada como fase móvel, para ajustar o pH, devido à sua volatilidade e características acidificantes) e a fase móvel B metanol, ambos de qualidade analítica dos laboratórios Panreac. A água ultrapura foi obtida de um sistema de purificação Milli-Q da marca Millipore. A eluição decorreu com um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ de acordo com o descrito na Tabela 11. O gradiente utilizado foi 5% B, 5 min; gradiente até 60% de B em 60 min; 60% B, 5 min; 5% B, 5 min.

Tabela 11. Gradiente de eluição utilizado na análise dos ácidos fenólicos dos frutos analisados por HPLC

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0.0	95.0	5.0
5.0	95.0	5.0
65.0	40.0	60.0
70.0	40.0	60.0
75.0	95.0	5.0

A detecção foi feita a 280 e a 325 nm e foi utilizado um programa de software Chromeleon (versão 6.8) (Sunnyvale, Califórnia, EUA) para traçar o perfil cromatográfico dos ácidos fenólicos. O volume de amostra injetado, concentrada 5 vezes (5:1) foi de 40 µL e o fluxo foi de 1 mL/min, sendo a análise realizada a 25 °C.

Cada um dos ácidos fenólicos individuais foi identificado tendo como base a ordem de eluição, os tempos de retenção e em alguns casos, os respectivos espectros de ultra violeta-visível, comparativamente ao apresentado na literatura.

Os resultados foram obtidos utilizando a equação de regressão ($y = 1,279x$) da reta obtida pela área do pico em função da concentração de ácido cafeico (50 a 500 mg/L).

8.9. Determinação da Capacidade Antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante foi efetuada pelo método DPPH, segundo Brand-Williams *et al.* (1995) e pelo método ABTS, segundo Miller *et al.* (1993). Os resultados obtidos basearam-se na percentagem de inibição de cada fruto, bem como na sua reta padrão e foram expressos em equivalentes trolox (ET).

a) Método DPPH

Num tubo juntaram-se 100 µL de amostra e 2 mL de DPPH, previamente preparado (com metanol 100% até atingir absorvâncias, medidas no espectrofotómetro, na ordem dos 0,700) e em seguida colocaram-se as amostras em sítio escuro, à temperatura ambiente, durante 30 minutos. Por fim procedeu-se à leitura das amostras num espectrofotómetro a um comprimento de onda de 515 nm. A análise foi feita em triplicado.

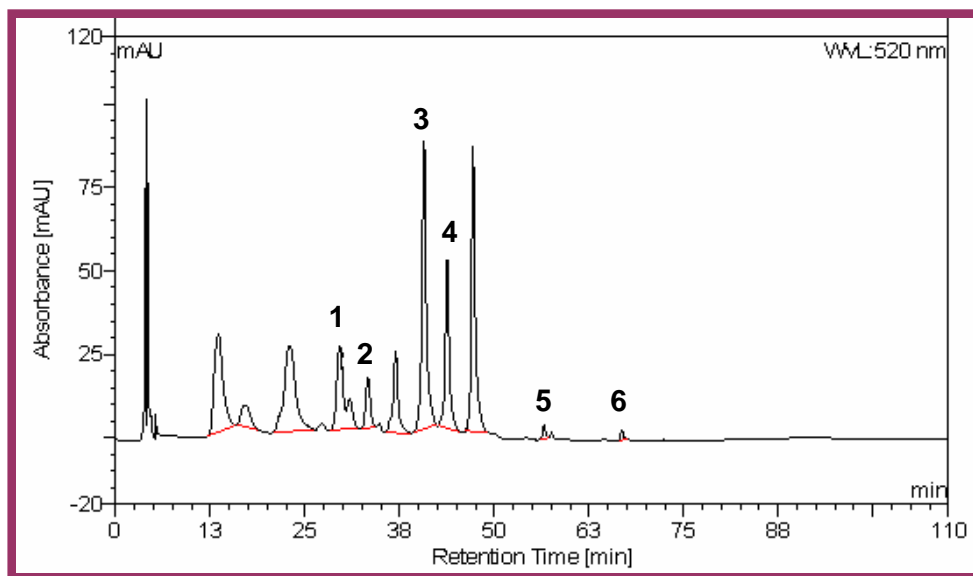
b) Método ABTS

Num tubo, juntaram-se 100 µL de amostra e 2 mL de ABTS, previamente preparado (com solução tamponada até atingir absorvâncias, medidas no espectrofotómetro, na ordem dos 0,700) e em seguida colocaram-se as amostras no escuro, à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Por fim procedeu-se à leitura das absorvâncias das amostras num espectrofotómetro a um comprimento de onda de 734 nm. Efetuaram-se 3 repetições em cada amostra.

9. Tratamento Estatístico

O tratamento estatístico foi feito por recurso ao programa “Statistica” versão 7.0. Foi realizada uma análise de variância (ANOVA 1-fator) seguida de um teste de comparação múltipla (Tukey’s Honestly Significant Difference test) para avaliar se as diferenças eram significativas. A análise estatística foi feita com um nível de significância de 0.05 de probabilidade.

IV. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS



10. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos na determinação dos compostos fenólicos totais, dos ácidos fenólicos, das antocianinas totais, do grau de polimerização das antocianinas e dos taninos totais dos três frutos estudados: framboesa, groselha e mirtilo. Além disso, são ainda apresentados os resultados referentes à capacidade antioxidante e à quantificação de algumas antocianinas monoméricas e ácidos fenólicos por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

10.1. Compostos Fenólicos Totais

O teor em compostos fenólicos totais, presentes nos extratos de metanol e de acetona dos frutos, foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de fruto fresco.

A Figura 26 mostra a evolução dos compostos fenólicos presentes nos extratos de metanol e de acetona para a framboesa.

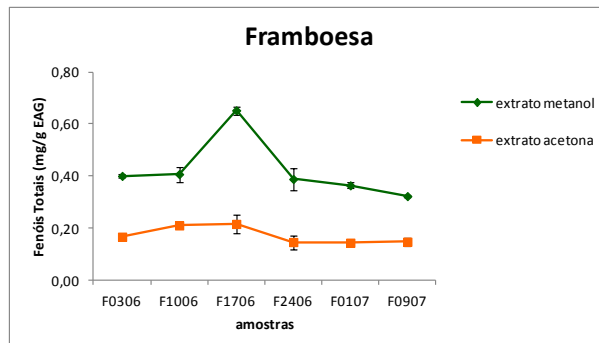


Figura 26. Evolução dos compostos fenólicos totais obtidos na framboesa ao longo da maturação nos dois extratos obtidos.

É possível verificar que, ao longo da maturação do fruto, o teor em compostos fenólicos manteve-se aproximadamente constante para os dois extratos e os valores obtidos no extrato metanol (0,32 - 0,65 mg/g EAG) foram sempre superiores aos valores obtidos no extrato acetona (0,14 - 0,22 mg/g EAG).

Na Figura 27, verificou-se que o teor em compostos fenólicos totais obtidos nos dois extratos da groselha, apesar de algumas oscilações, diminuiu ao longo da maturação.

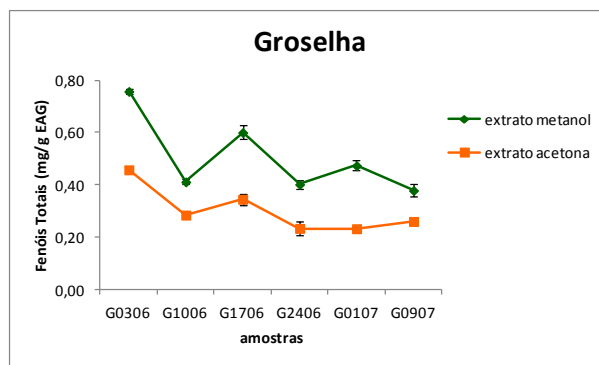


Figura 27. Evolução dos compostos fenólicos totais obtidos na groselha ao longo da maturação nos dois extratos obtidos.

À semelhança da framboesa, os valores de compostos fenólicos obtidos foram superiores no extrato metanol (0,38 - 0,76 mg/g EAG) do que no extrato acetona (0,23 - 0,46 mg/g EAG). No final da maturação, dia 9 de Julho (0907), a quantidade de compostos fenólicos no extrato de metanol era 82% mais elevada do que no extrato de acetona.

A Figura 28 representa a evolução dos compostos fenólicos totais obtidos no mirtilo para os dois extratos.

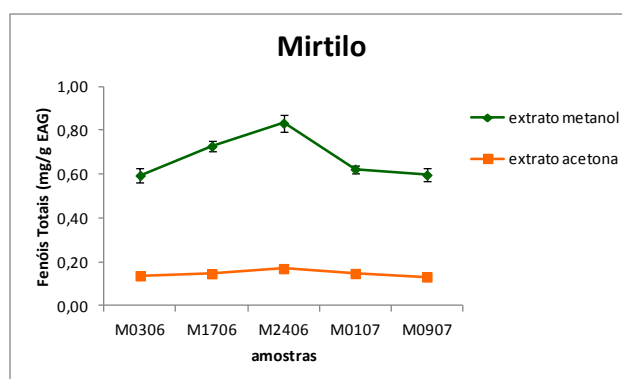


Figura 28. Evolução dos compostos fenólicos totais obtidos no mirtilo ao longo da maturação nos dois extratos obtidos.

No extrato metanol verificou-se um ligeiro aumento do teor de compostos fenólicos até ao terceiro dia de colheita de amostra, seguido de uma diminuição até ao final da maturação. Por outro lado, no extrato de acetona, os valores obtidos foram sempre constantes ao longo da maturação. No mirtilo também se verificou que, no extrato metanol, se obteve maior teor em compostos fenólicos totais, tal como Spagolla *et al.* (2009) verificaram para o mirtilo de variedade “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) em condições semelhantes de extração e determinação.

A Figura 29 mostra a quantidade total de compostos fenólicos obtidos no conjunto dos dois extratos, para cada um dos três frutos.

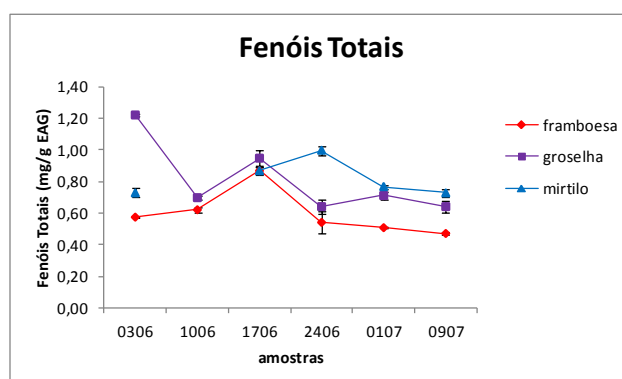


Figura 29. Evolução dos teores em compostos fenólicos totais nos três frutos estudados ao longo da maturação.

De uma forma geral, todos os frutos tiveram o mesmo comportamento ao longo da maturação. Inicialmente a amostra de groselha colhida no dia 3 de Junho (0306) apresentou valores bastantes superiores (1,22 mg/g EAG) em relação aos outros dois frutos.

Em relação aos três frutos estudados, foi na framboesa que se obtiveram os valores mais baixos de compostos fenólicos totais, ao longo de todo o tempo de maturação.

No final da maturação (Figura 30), os três frutos apresentaram valores de compostos fenólicos estatisticamente diferentes (nível de significância $p < 0,05$). A amostra de mirtilo (0,73 mg/g EAG) apresentava o valor mais elevado, seguida da amostra de groselha (0,64 mg/g EAG) e por último, a framboesa (0,47 mg/g EAG). Estes valores são inferiores aos obtidos por KusKoski *et al.* (2006), para a uva (1,17 mg/g EAG), amora (1,18 mg/g EAG) e morango (1,32 mg/g EAG), em condições experimentais semelhantes. Da mesma forma, Sun *et al.* (2002) determinaram na uva (1,82 mg/g EAG) e no morango (1,48 mg/g EAG) valores mais elevados em compostos fenólicos totais.

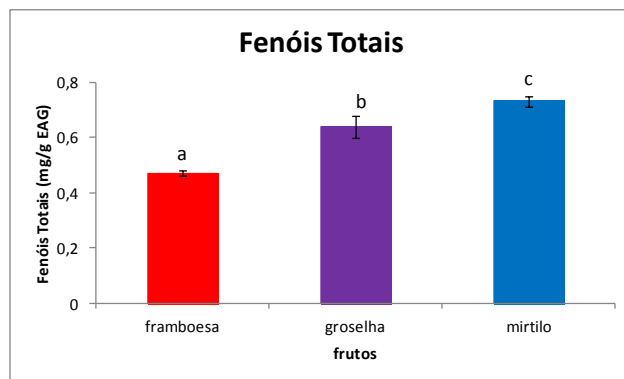


Figura 30. Teor em compostos fenólicos totais nos três frutos estudados no final da maturação. Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Estudos apresentados por Rockenbach *et al.*, (2008) demonstram que, em condições de extração similares, o teor de compostos fenólicos totais para o extrato metanólico da fruta *fisalis* foi de 0,58 mg/g EAG. Também Wu *et al.* (2006) encontraram valores de compostos fenólicos totais em diferentes extratos de *fisalis* variando entre 0,15 e 0,91 mg/g EAG por extrato.

10.2. Taninos Totais

A Figura 31 mostra a evolução da quantidade de taninos totais na framboesa, na groselha e no mirtilo ao longo da maturação.

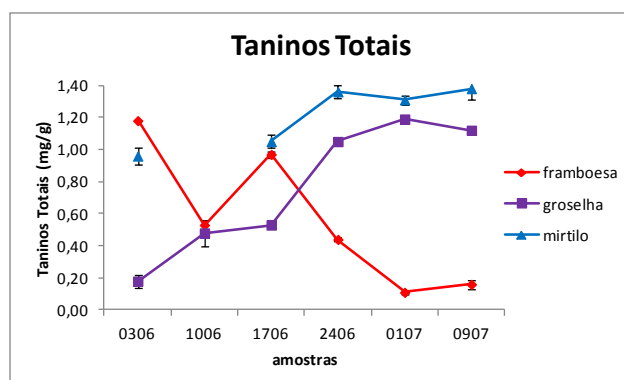


Figura 31. Evolução dos teores em taninos totais nos frutos estudados ao longo da maturação.

Ao longo da maturação, apesar de algumas oscilações, verifica-se um aumento dos taninos totais no mirtilo e na groselha, e uma diminuição acentuada na framboesa. No mirtilo obtiveram-se quantidades de 0,96 - 1,38 mg/g e na groselha

0,48 - 1,19 mg/g. Na framboesa obtiveram-se valores de 0,16 - 1,18 mg/g. O valor em taninos quantificados no final da maturação (9 de julho) era para cada um dos frutos estatisticamente diferente (nível de significância de $p < 0,05$) do valor obtido no início da maturação (3 de junho).

No final da maturação (Figura 32), os três frutos apresentavam valores de taninos totais estatisticamente diferentes (nível de significância $p < 0,05$). Os teores mais elevados foram obtidos no mirtilo (1,38 mg/g) e na groselha (1,12 mg/g).

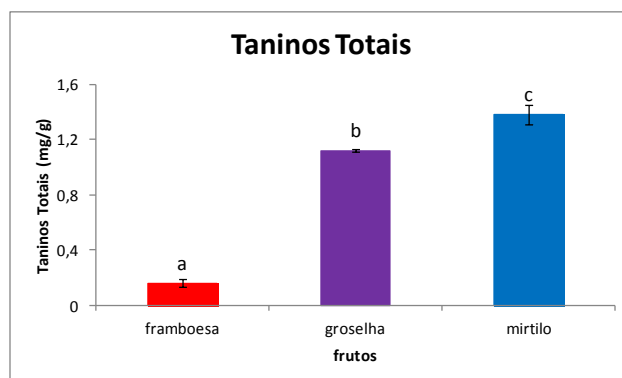


Figura 32. Teores em taninos totais nos frutos em estudos no final da maturação. Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

10.3. Antocianinas

10.3.1. Antocianinas Totais

A Figura 33 apresenta a evolução dos teores em antocianinas totais quantificadas ao longo da maturação dos três frutos.

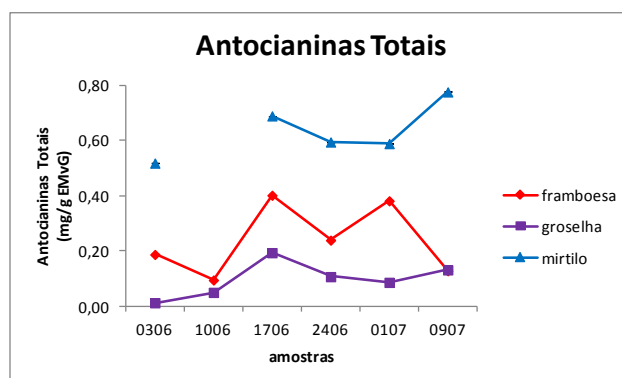


Figura 33. Evolução dos teores em antocianinas totais quantificadas nos frutos estudados ao longo da maturação.

Da análise à Figura 33 verificou-se que ao longo da maturação, apesar de algumas oscilações, no mirtilo e na groselha o teor das antocianinas quantificadas aumentou, ao contrário da framboesa que diminuiu o seu teor no final da maturação. Verificou-se também que o mirtilo ao longo da maturação e, regra geral, foi o fruto que apresentou maior quantidade de antocianinas totais (0,52 - 0,78 mg/g EMvG), seguido da framboesa (0,10 - 0,40 mg/g EMvG) e da groselha (0,01 - 0,19 mg/g EMvG).

No final da maturação (Figura 34), no mirtilo obtiveram-se os teores mais elevados em antocianinas totais (0,78 mg/g EMvG). Comparando os diferentes frutos, o teor em antocianinas totais quantificadas no mirtilo foi estatisticamente superior à groselha e à framboesa (nível de significância $p < 0,05$).

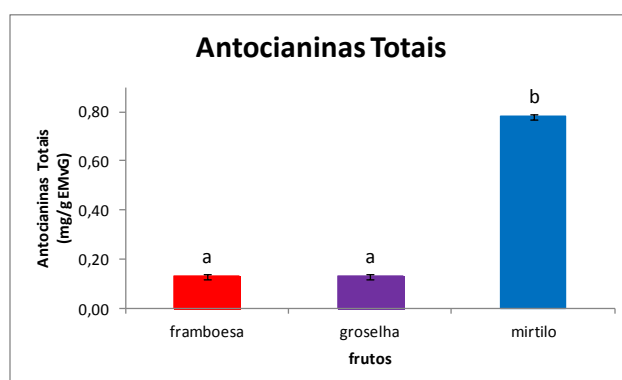


Figura 34. Quantificação do teor em antocianinas totais nos frutos estudados no final da maturação. Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

O teor em antocianinas totais obtido no mirtilo era superior ao obtido por Rocha (2009), em condições de determinação similares, para a variedade *Vaccinium myrtillus* (0,58 mg/g EMvG) e semelhante ao obtido por Pertuzatti *et al.* (2007) (0,81 mg/g EMvG) para a variedade de mirtilo Powder *Delite*. Kuskoski *et al.* (2006) obtiveram teores em antocianinas totais para a amora (0,42 mg/g EMvG), para a uva (0,31 mg/g EMvG) e para o morango (0,24 mg/g EMvG) inferiores aos obtidos para o mirtilo e superiores aos da framboesa e groselha.

10.3.2. Percentagem de Polimerização

As antocianinas totais podem apresentar-se na natureza sob a forma de monómeros, polímeros e co-pigmentadas. As seguintes figuras mostram em termos percentuais as diferentes formas de polimerização das antocianinas na framboesa, na groselha e no mirtilo.

Ao longo da maturação da framboesa (Figura 35) nota-se um aumento das formas co-pigmentadas e uma diminuição das formas monoméricas. No final da maturação, cerca de 65% das formas eram co-pigmentadas, 15% poliméricas e 20% monoméricas.

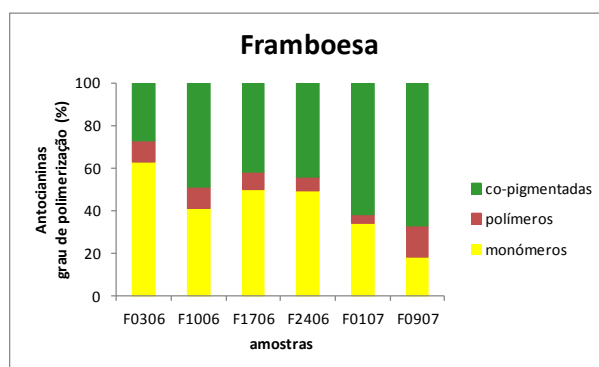


Figura 35. Evolução da percentagem de polimerização das antocianinas encontradas na framboesa ao longo da maturação.

Em relação à groselha (Figura 36) é notória, ao longo da sua maturação, uma diminuição das formas monoméricas e um aumento das formas co-pigmentadas e poliméricas. No início da maturação as formas monoméricas representavam 93% das antocianinas totais, enquanto no final da maturação representavam apenas 16%. No final da maturação, 67% das antocianinas estavam na forma co-pigmentada e 17% na forma polimérica.

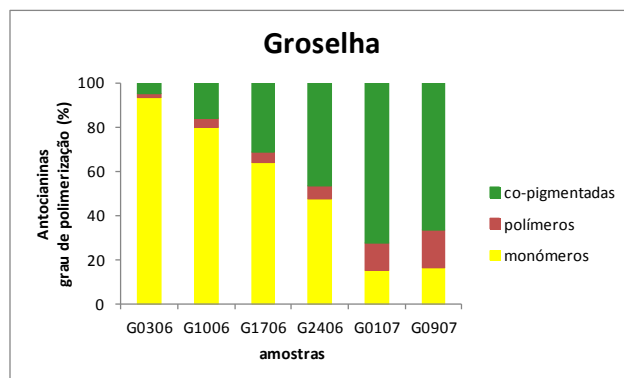


Figura 36. Evolução da porcentagem de polimerização das antocianinas encontradas na groselha ao longo da maturação.

A evolução ao longo da maturação das diferentes formas das antocianinas no mirtilo (Figura 37) mostrou uma tendência para a diminuição das formas monoméricas, no entanto de forma menos pronunciada do que nos casos da groselha e da framboesa.

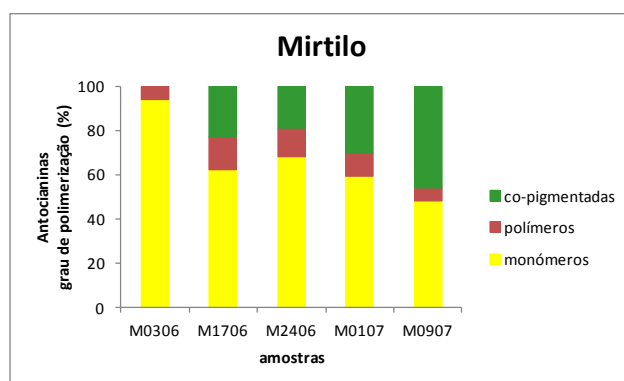


Figura 37. Evolução da porcentagem de polimerização das antocianinas encontradas no mirtilo ao longo da maturação.

No início da maturação, 94% das antocianinas estavam na forma monomérica e no final representavam 48% do total das antocianinas, valor muito superior aos 20 e 16% verificados para a framboesa e groselha, respetivamente.

10.3.3. Antocianinas monoméricas

De seguida, a Figura 38 apresenta os perfis antociânicos obtidos por HPLC para os frutos estudados.

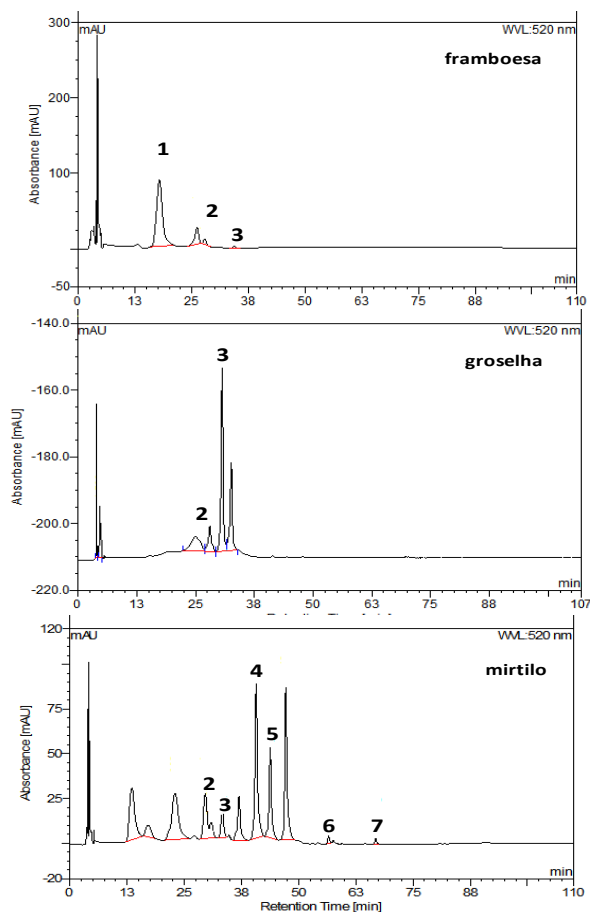


Figura 38. Perfil cromatográfico relativo às antocianinas monoméricas quantificadas na framboesa, na groselha e no mirtilo no final da maturação. **(1)** delphinidina-3-glucósido **(2)** cianidina-3-glucósido **(3)** petunidina-3-glucósido **(4)** peonidina-3-glucósido **(5)** malvidina-3-glucósido **(6)** petunidina-3-acetilglucósido **(7)** malvidina-3-acetilglucósido.

A Tabela 12 evidencia as concentrações obtidas, expressas em $\mu\text{g/g}$ EMvG, das antocianinas monoméricas identificadas nos três frutos em estudo no final da maturação.

Tabela 12. Concentrações obtidas das antocianinas identificadas nos frutos estudados no final da maturação.

Antocianinas ($\mu\text{g EMvG}$)	Fruto		
	framboesa	groselha	mirtilo
delfinidina-3-glucósido	106,27	n.d.	n.d.
cianidina-3-glucósido	3,95	4,84	17,85
petunidina-3-glucósido	1,36	21,94	8,40
peonidina-3-glucósido	n.d.	n.d.	45,25
malvidina-3-glucósido	n.d.	n.d.	24,96
petunidina-3-acetilglucósido	n.d.	n.d.	1,41
malvidina-3-acetilglucósido	n.d.	n.d.	1,07

Na framboesa foram identificadas as seguintes antocianinas monoméricas: delfinidina-3-glucósido, cianidina-3-glucósido e petunidina-3-glucósido. De entre as antocianinas identificadas em maior quantidade foi a delfinidina-3-glucósido com 106,27 $\mu\text{g/g EMvG}$. Estes resultados obtidos estão de acordo com estudos realizados por Obón *et al.* (2011) e Goiffon *et al.* (1999), para o mesmo fruto e em condições similares de determinação.

Para a groselha, as antocianinas identificadas foram a cianidina-3-glucósido e a petunidina-3-glucósido. A antocianina com maior concentração obtida na groselha foi a petunidina-3-glucósido com 21,94 $\mu\text{g/g EMvG}$. A presença destas antocianinas na groselha foi anteriormente descrita por outros autores (Goiffon *et al.*, 1999, Wu e Prior, 2005).

Quanto ao mirtilo, foi o fruto onde foi possível identificar o maior número de antocianinas monoméricas, tais como, cianidina-3-glucósido, petunidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido, malvidina-3-glucósido, petunidina-3-acetilglucósido e malvidina-3-glucósido. O total de antocianinas quantificadas foi de 98,9 $\mu\text{g/g EMvG}$. A peonidina-3-glucósido, a malvidina-3-glucósido e a cianidina-3-glucósido foram as antocianinas presentes em maior concentração, representando 46, 25 e 18%, respetivamente, do total quantificado. As restantes antocianinas representavam, em conjunto, 11% do total. Estas antocianinas identificadas estão de acordo com estudos realizados por outros autores (Del Rio *et al.*, 2010, Obón *et al.*, 2011 e Versari *et al.*, 1997) para o mirtilo.

10.4. Análise dos Ácidos Fenólicos por HPLC

Relativamente aos ácidos fenólicos presentes nos frutos estudados, estes foram analisados por HPLC recorrendo-se à sua deteção através da utilização de dois comprimentos de onda (280 e 325 nm). A Figura 39 apresenta os diferentes perfis obtidos relativamente aos ácidos fenólicos detetados na framboesa, na groselha e no mirtilo, respetivamente.

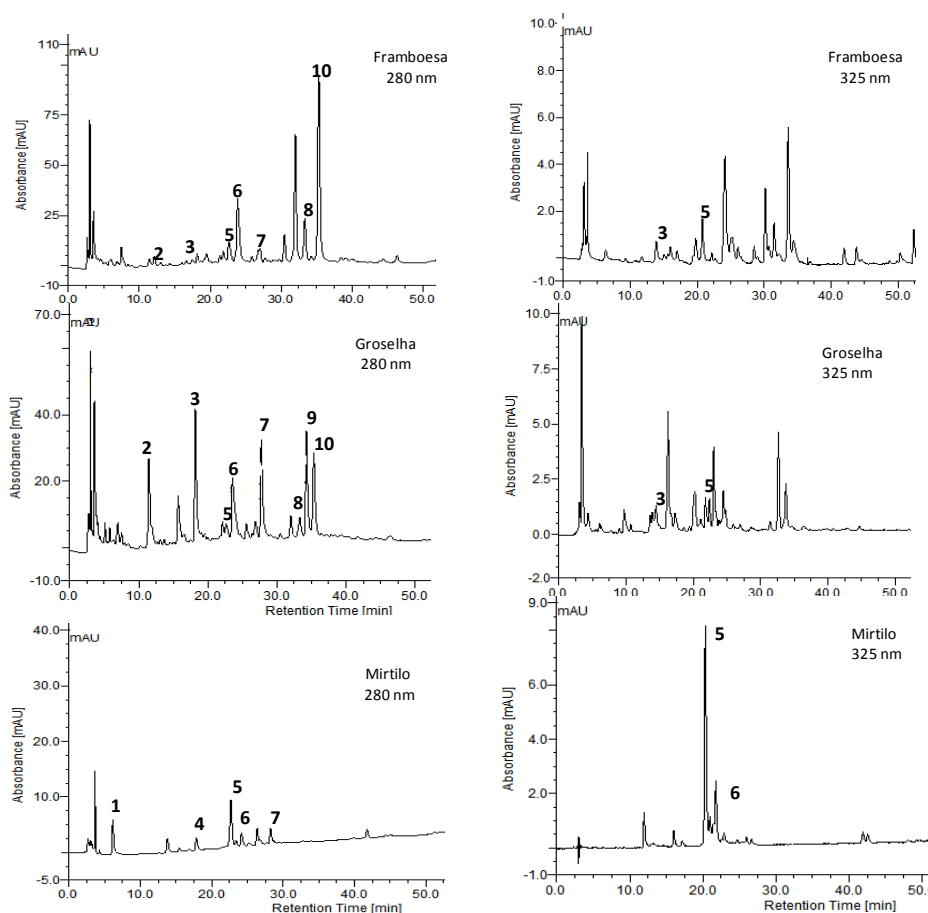


Figura 39. Perfis cromatográficos (280 e 325 nm) relativos aos ácidos fenólicos quantificados nos frutos em estudo, no final da maturação. **(1)** gálico **(2)** protocatequínico **(3)** caftárico **(4)** *p*-hidroxibenzóico **(5)** clorogénico **(6)** vanílico **(7)** siríngico **(8)** cumárico **(9)** hidroxicinâmico **(10)** ferúlico.

A Tabela 13 evidencia os ácidos fenólicos identificados e quantificados a comprimento de onda de 280 nm, nos respetivos frutos em estudo no final da maturação.

Tabela 13. Concentrações obtidas dos ácidos fenólicos identificados nos frutos estudados no final da maturação.

Ácidos Fenólicos (µg/g EAG)	Fruto		
	framboesa	groselha	mirtilo
ácidos benzóicos			
protocatequínico	1,10	7,98	n.d.
vanilínico	10,94	1,27	0,58
siríngico	2,44	1,29	0,91
gálico	n.d.	n.d.	1,27
<i>p</i> -hidroxibenzóico	n.d.	n.d.	0,54
ácidos cinâmicos			
clorogénico	3,07	1,27	2,15
cumárico	6,23	2,10	n.d.
hidroxicinâmico	n.d.	8,81	n.d.
ferúlico	27,26	7,97	n.d.
caftárico	1,06	3,58	n.d.

Na framboesa foram detetados os ácidos benzóicos protocatequínico, vanilínico e siríngico e os ácidos cinâmicos clorogénico, cumárico, ferúlico e caftárico. De entre estes ácidos, os que se apresentaram com maiores concentrações foram o ácido ferúlico com 27,25 µg/g EAG e o ácido vanílico com 10,94 µg/g EAG. Os ácidos fenólicos identificados estão de acordo com os resultados de estudos obtidos, para o mesmo fruto, por Obón *et al.* (2011) e Russell *et al.* (2009) em condições semelhantes.

Na groselha foi possível detetar os seguintes ácidos benzóicos (protocatequínico, vanilínico e siríngico) e os ácidos cinâmicos (clorogénico, cumárico, hidroxicinâmico, ferúlico e caftárico). Obtiveram-se para o ácido hidroxicinâmico e protocatequínico as concentrações mais elevadas, 8,81 e 7,98 µg/g EAG, respetivamente. Foi neste fruto que se identificou e quantificou maior número de ácidos fenólicos em relação aos três frutos estudados. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados, para o mesmo fruto e sob condições similares, por Russell *et al.* (2009).

No mirtilo, os ácidos benzóicos obtidos foram o vanilínico, o siríngico, o gálico, o *p*-hidroxicinâmico e o ácido cinâmico clorogénico. Com maiores concentrações obtidas foram o ácido clorogénico com 2,15 µg/g EAG e o ácido gálico com 1,27

$\mu\text{g/g}$ EAG. Estes compostos detetados estão de acordo com estudos obtidos, para o mesmo fruto e condições similares, por Obón *et al.* (2011).

10.5. Capacidade Antioxidante

Relativamente à capacidade antioxidante dos frutos em estudo, seguem-se os resultados obtidos para o extrato metanol e para o extrato acetona pelos dois métodos aplicados, método DPPH e método ABTS.

De acordo com a Figura 40, a evolução da capacidade antioxidante do extrato metanol determinada pelo método DPPH para os frutos em estudo, manteve-se constante, embora na groselha tenham sido detetadas oscilações maiores ao longo da maturação. Os valores de capacidade antioxidante obtidos na framboesa foram de 0,31 - 0,43 mg/g ET, na groselha 0,30 - 0,59 mg/g ET e no mirtilo 0,31 - 0,40 mg/g ET.

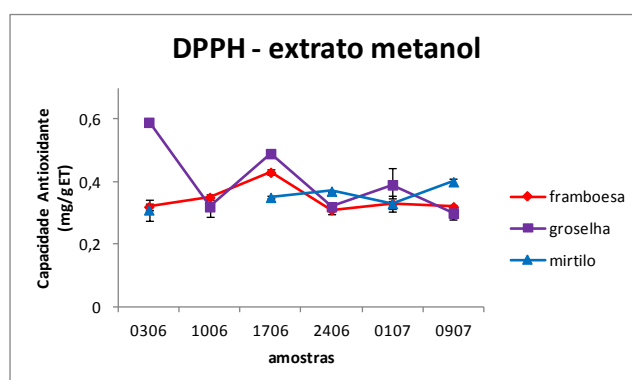


Figura 40. Evolução da capacidade antioxidante quantificada no extrato metanol pelo método DPPH, ao longo da maturação nos três frutos estudados.

Em relação ao extrato acetona determinado pelo método DPPH (Figura 41), ocorreu em geral, uma diminuição da atividade antioxidante ao longo da maturação dos frutos, sendo que na groselha se obteve uma ligeira maior atividade antioxidante que variou entre 0,21 e 0,43 mg/g ET.

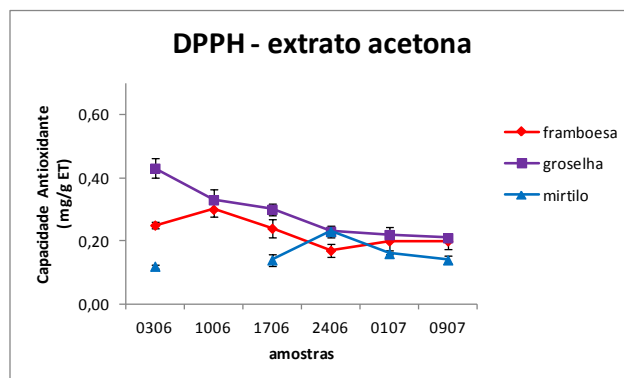


Figura 41. Evolução da capacidade antioxidante quantificada no extrato acetona pelo método DPPH, ao longo da maturação dos três frutos estudados.

No final da maturação (Figura 42), comparando os três frutos estudados, a capacidade antioxidante dos mesmos pelo método DPPH, no total dos extratos estudados, foi estatisticamente igual (nível de significância $p < 0,05$).

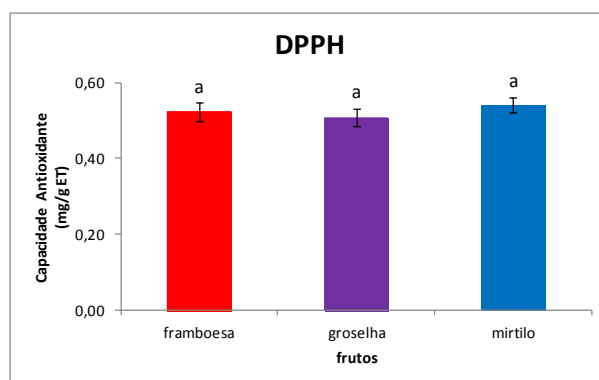


Figura 42. Capacidade antioxidante quantificada nos frutos estudados, pelo método DPPH, no final da maturação. Letras iguais indicam que os valores são estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

Pelo método ABTS, no extrato metanol (Figura 43), ao longo da sua maturação, a framboesa e a groselha foram mantendo a sua capacidade antioxidante constante. No mirtilo, a capacidade antioxidante aumentou ao longo da maturação e obtiveram-se valores entre 3,72 e 5,77 mg/g ET.

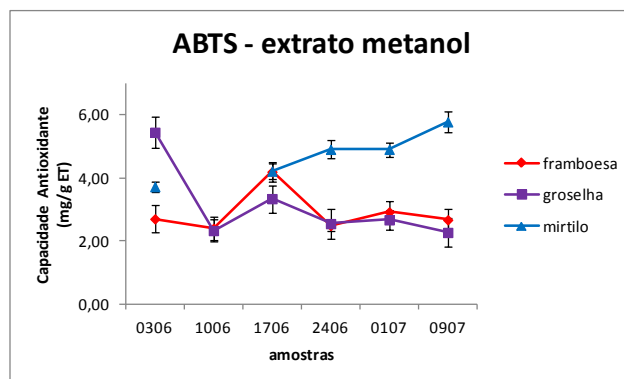


Figura 43. Evolução da capacidade antioxidante quantificada no extrato metanol pelo método ABTS, ao longo da maturação nos três frutos estudados.

A Figura 44 mostra a evolução da capacidade antioxidante do extrato acetona dos frutos em estudo, pelo método ABTS.

Nesta figura pode-se verificar que para os três frutos, inicialmente ocorreu um ligeiro aumento seguido de uma diminuição da sua atividade antioxidante até ao final da maturação.

Observa-se também que os valores obtidos pela groselha (0,39 - 0,54 mg/g ET) e pela framboesa (0,28 - 0,50 mg/g ET) foram superiores em relação ao mirtilo (0,20 - 0,30 mg/g ET).

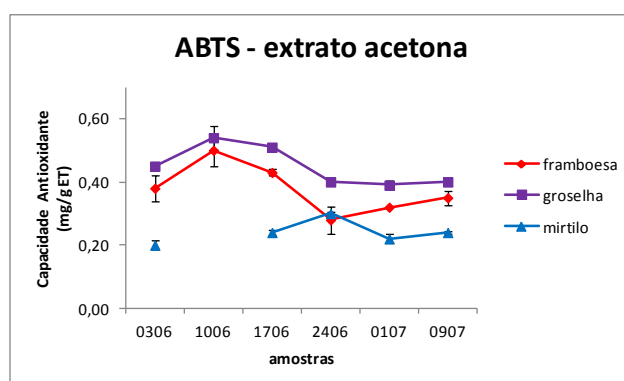


Figura 44. Evolução da capacidade antioxidante quantificada no extrato acetona pelo método ABTS, ao longo da maturação nos três frutos estudados.

No final da maturação (Figura 45), comparando os três frutos estudados, a capacidade antioxidante do mirtilo, pelo método DPPH, foi estatisticamente superior à capacidade antioxidante da framboesa e da groselha no total dos extratos estudados (nível de significância $p < 0,05$).

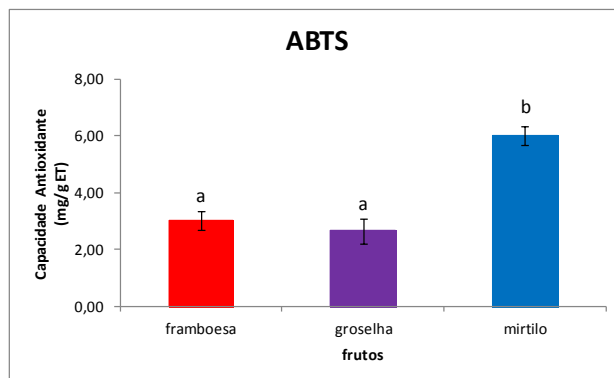


Figura 45. Capacidade antioxidante quantificada nos frutos estudados, pelo método ABTS, no final da maturação. Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

10.6. Correlação da composição fenólica com a atividade antioxidante

A Tabela 14 evidencia a correlação dos resultados obtidos entre a composição fenólica dos frutos estudados e a sua capacidade antioxidante.

Tabela 14. Correlação dos resultados obtidos entre a composição fenólica e a atividade antioxidante dos frutos estudados ao longo da maturação.

R ²	Capacidade Antioxidante			
	extrato metanol		extrato acetona	
	ABTS	DPPH	ABTS	DPPH
CFTotais	0,72	0,34	<0,10	<0,10
Taninos Totais	0,10	<0,10		
Antocianinas Totais	0,44	<0,10		

Da análise à Tabela 14 observou-se maior correlação entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante pelo método ABTS ($R^2=0,72$), no extrato metanol, tal como Vedana *et al.*, (2008), para condições similares.

As antocianinas totais também obtiveram maior correlação ($R^2 = 0,44$) com a atividade antioxidante pelo método ABTS no extrato metanol.

V. CONCLUSÕES



11. CONCLUSÕES

Relativamente ao estudo dos três frutos (framboesa, groselha e mirtilo) face à evolução dos seus teores nos vários parâmetros analisados até ao final da maturação concluiu-se que, em relação aos seus compostos fenólicos totais todos os frutos diminuíram os seus valores desde o início da maturação nos dois extratos estudados, sendo que no extrato metanol, os teores em compostos fenólicos foram sempre superiores, face ao extrato acetona nos três frutos. O mirtilo foi o fruto onde se obtiveram maiores teores de compostos fenólicos totais também para os dois extratos.

Os teores em taninos totais e antocianinas totais quantificados no mirtilo e na groselha aumentaram ao longo da maturação. Pelo contrário, a framboesa possuía teores mais baixos destes compostos no final da maturação, quando comparados com o início da maturação. No final da maturação, os teores mais elevados de taninos e de antocianinas observaram-se no mirtilo.

Ao longo da maturação verificou-se, para os três frutos, uma diminuição da percentagem relativa das formas monoméricas das antocianinas.

Relativamente à identificação e quantificação das antocianinas monoméricas detetadas por HPLC, no final da maturação, foi no mirtilo que se observou maior quantidade de antocianinas. Em termos de ácidos fenólicos, também detetados por HPLC, no final da maturação, verificou-se que foi na groselha que se identificaram e quantificaram mais ácidos fenólicos (benzóicos e cinâmicos).

No final da maturação, todos os frutos estudados obtiveram valores semelhantes de capacidade antioxidante quando determinada pelo método DPPH. Relativamente ao método ABTS, o mirtilo, apresentava valores superiores de atividade antioxidante.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antolovich M, Prenzeler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K (2002) Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 1, 183-198.

Barros A, Mendes FR (1983) Formas de produção e estatutos de trabalho na agricultura portuguesa. Comunicação apresentada ao Seminário Internacional sobre “As agriculturas da Europa Mediterrânica: os Homens e o Trabalho”. Instituto de Ciências Sociais.

Bakowska-Barczak A, Kolodziejczyk PP (2011) Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*, 34, 1301-1309.

Borges LL, Lúcio TC, Gil ES, Barbosa EF (2011) Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da actividade antioxidante em produtos naturais. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer de Goiânia*, 7, 12.

Boulton R (2000) The variation in skin composition and wine color for six vineyard sites. 3rd International Burgundy-California-Oregon Colloquium, Institut Jules Guyot. L'institut Universitaire de la Vigne et Vin “Jules Guyot”, Dijon, France.

Boulton R (2001) The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 2, 67-87.

Bourzeix M (1976) Les composés phénoliques des raisins et du vin. Leurs effects sur la qualité. *Revision Francese, Oenol*, 63, 53-69.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Science Technologie*, 28, 25-30.

Cassidy A, Hanley B, Lamuela-Raventos, RM. (2000) Isoflavones, lignans and stilbenes - origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal Science Food Agriculture* 80, 7, 1044-1062.

Cheynier V, Rigaud J, Souquet JM, Barillere JM, Moutounet M (1989) Effect of pomace contact and hyperoxidation on the phenolic composition and quality of grenache and chardonnay wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40, 1, 36-42.

Connor DJ (2008) Organic agriculture cannot feed the world. Short communication. *Field Crops Research*, 106, 187-190.

Corte-Real DCC (2009) Efeitos da maceração pré-fermentativa a frio e da aplicação de taninos enológicos na vinificação de tintos – Estudo em plantas jovens. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Viticultura e Enologia. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 2009.

Cunha MJ, Amaro R, Oliveira A, Casau F (2005) *Tecnologias Limpas em Agro-Pecuária*. Sociedade Portuguesa de Inovação, 1ª Edição, Porto, 5.

Del Rio D, Borges G, Crozier A (2010) Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *British Journal of Nutrition*, 104.

Dallas C, Laureano O (1994) Effect of SO₂ on the extraction of individual anthocyanins and colored matter of three Portuguese grape varieties during winemaking. *Vitis*, 33, 41-47.

Davies A, Mazza G (1993) Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 41, 716-720.

Del Rio D, Borges G, Crozier A (2010) Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *British Journal of Nutrition*, 104, 67-90.

Eiro MJ, Heinonen M (2002) Anthocyanin color behavior and stability during storage: effect of intermolecular copigmentation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 7461-7466.

Fernandes ASF (2010) Propriedades nutricionais, nutracêuticas e antioxidantes de espécies silvestres condimentares utilizadas na gastronomia tradicional do nordeste transmontano. Dissertação para obtenção de Grau Mestre. Instituto Politécnico de Bragança Escola Superior Agrária de Bragança.

Ferreira D, Guyot S, Marnet N, Delgadillo RC, Coimbra MA (2002) Composition of Phenolic Compounds in a Portuguese Pear (*Pyrus communis* L. Var. S. Bartolomeu) and Changes after Sun-Drying. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 4537-4544.

Ferreira ICFR, Abreu RMV (2007) Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. Artigo de Revisão. Sociedade Portuguesa de Bioanalistas da Saúde. Ano IV Nº2. Julho/Dezembro.

Ferreira JC, Strecht A, Ribeiro JR, Soeiro A, Cotrim G (2002) Manual de agricultura biológica – fertilização e proteção das plantas para uma agricultura sustentável. 3ª Edição. AGROBIO, Lisboa.

Gonçalves R (2007) Estudo da inibição de tripsina por compostos fenólicos isolados de fontes naturais. Efeito anti nutricional de bebidas comuns. Tese de mestrado. Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Setembro.

Gonçalves SMPA (2005) A Agricultura Biológica em Portugal: (d)as problemáticas e (a)os problemas. Dissertação para obtenção de Grau de Mestre. Faculdade de Letras da Universidade do Porto.

Goiffon JP, Brun M (1991) High-Performance liquid chromatography of red fruit anthocyanins. *Journal of Chromatography*, 537, 101-121.

Goiffon JP, Mouly PP, Gaydou EM (1999) Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 382, 39-50.

Gu L, Kelm MA (2004) Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *Journal of Nutrition*, 134, 613-617.

Hassimotto NHA (2005) Actividade antioxidante de alimentos vegetais. Estrutura e estudo da biodisponibilidade de antocianinas de amora-silvestre (*Morus* sp.). Tese para obtenção de grau de Doutor. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.

Heredia F, Francia-Aricha E, Rivas-Gonzalo J, Vicario, I, Santos-Buelga C (1988) Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes – I. pH effect. *Food Chemistry*, 63, 491-498.

Hirata LL, Sato MEO, Santos CAM (2004) Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. Programa Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Departamento de Farmácia. Sector de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Pará, Brasil, 418-424.

Hollands W, Brett GM, Radrean P, Teucher B, Bennett RN, Kroon PA (2008) Processing black currants dramatically reduces the content and does not enhance, the urinary yield of anthocyanins in human subjects. *Food Chemistry*, 108, 869-878.

Ilkay K, Bulent K (2009) Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. *Scientia Horticulturae*, 121, 447-450.

Kähkönen M, Heinämäki J (2003) Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 14, 1403-1411.

Koca I, Karadeniz B (2009) Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. *Scientia Horticulturae*, 121, 447-450.

Kuskoski EM, Asuero AG, Morales MT, Fett R (2006) Wild fruits and pulps of frozen fruits: antioxidant activity, polyphenols and anthocyanins. *Ciência Rural*, 36, 4, 1283-1287.

Laaksonen O, Sandell M, Nordlund E, Heiniö RL, Malinen HL, Jaakkola M, Kallio Heikki (2011) The effect of enzymatic treatment on black currant (*Ribes nigrum* L.) juice flavour and its stability. *Food Chemistry*, 130, 31-41.

Lampkin NH (1990) *Organic farming*. Farming Press. Ipswich, 701.

Magalhães LM, Segundo MA, Siquet C, Reis S, Lima JLFC (2005) Determinação e aplicação de uma metodologia automática para determinação da capacidade antioxidante em alimentos. 7^o Encontro de Química dos Alimentos, Viseu.

Marques C, Duthoit M, Alvarenga B, Roseiro LB (2004) Implementação e validação do método de Folin-Ciocalteu para a determinação do teor em compostos fenólicos totais – aplicação a extratos de flor de cardo e queijo. Tese de Licenciatura, Instituto Politécnico de Beja, Escola Superior Agrária de Beja, Beja.

Mazza G. e Brouillard R. (1987) Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chemistry*, 25, 207-225.

Mazza G, Fukumoto L, Delaquis P, Girard B, Ewert B (1999) Anthocyanins, phenolics and color of *Cabernet Franc*, *Merlot* and *Pinot Noir* wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 10, 4009-4017.

Miller NJ, Rice-Evans CA, Davies MJ, Gopinathan V & Milner A (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84, 407-412.

Mullen W, McGinn J (2002) Ellagitannins, Flavonoids, and Other Phenolics in Red Raspberries and Their Contribution to Antioxidant Capacity and Vasorelaxation Properties. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, 50, 18, 5191-5196.

Obón JM, Díaz-García MC, Castellar MR (2011) Red fruit juice quality and authenticity control by HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*, Article in Press.

Oliveira PB, Fonseca LL, Silva AR (2007) Diversificação da produção frutícola com novas espécies e tecnologias que assegurem a qualidade agro-alimentar. Edição no âmbito do Projecto PO AGRO DE&D nº 556. Folhas de divulgação AGRO 556 nº 3. MADRP, Lisboa, Novembro.

Oliveira PB, Valdivieso T, Esteves A, Mota M, Fonseca LL (2007) A planta de Framboesa. Edição no âmbito do Projecto PO AGRO DE&D nº 556 “Diversificação da produção frutícola com novas espécies e tecnologias que assegurem a qualidade agro-alimentar”. Folhas de Divulgação AGRO 556 nº1. MADRP, Lisboa, Novembro.

Pantelidis GE, Vasilakakis M, Manganaris GA, Diamantidis G (2007) Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in

raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*, 102, 777-783.

Pap N, Pongrácz E, Jaakkola M, Tolonen T, Virtanen V, Turkki A, Horváth-Hovorka Z, Vatai G, Keiski RL (2010) The effect of pre-treatment on the anthocyanin and flavonol content of black currant juice (*Ribes nigrum* L.) in concentration by reverse osmosis. *Journal of Food Engineering*, 98, 429-436.

Pereira MOS (2010) Estudo comparativo de Métodos de Avaliação da Capacidade Antioxidante de Compostos Bioactivos. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia.

Pertuzatti PB, Jacques AC, Zambiasi RC (2007) Relação de Fitoquímicos na casca e polpa de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade). XVI Congresso de Iniciação Científica. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Novembro.

Rocha FIG (2009) Avaliação da cor e da actividade antioxidante da polpa e extracto de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) em Pó. Dissertação para obtenção de grau Mestre. Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Rockenbach II, Rodrigues E, Cataneo C, Gonzaga LV, Lima A, Mancini-Filho J, Fett R (2008) Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis Peruviana* L. *Alimentação e Nutrição*, Araraquara, 19, 3, 271-276.

Russell WR, Labat A, Scobbie L, Duncan GJ, Duthie GG (2009) Phenolic acid content of fruits commonly consumed and locally produced in Scotland. *Food Chemistry*, 115, 100-104.

Sandhu HS, Wratten SD, Cullen R (2010) Organic agriculture and ecosystem services. *Environmental Science & Policy*, 13, 1-7.

Santos-Buelga C, Scalbert A (2000) Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 7, 1094-1117.

Serrado F, Pereira M, Freitas S, Martins S, Dias T (2008) Mirtilos – guia de boas práticas para produção, promoção e comercialização. ADRIMAG, Junho.

Silva MLC, Costa RS, Santana AS, Koblitz MGB (2010) Compostos fenólicos, carotenóides e actividade antioxidante em produtos vegetais. *Revista Ciências Agrárias*, 3, 669-682.

Simões MACD (2007) A Tecnologia como auxiliar na Agricultura Biológica em Estufa. Dissertação submetida para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologias das Engenharias. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Departamento de Engenharias. Vila Real.

Singleton VL & Rossi A (1965) Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

Soares S (2002) Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 15, 1, 71-81.

Sousa JBASP (2008) Atividade Biológica de derivados do Ácido Cafeico: Efeito antioxidante e anti-inflamatório. Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Controlo de Qualidade. Universidade do Porto. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Porto.

Sousa MB, Curado T, Negrão e Vasconcellos F, Trigo MJ (2007) Framboesa – Qualidade Pós-Colheita. Edição no âmbito do Projeto PO AGRO DE&D Nº 556. Folhas de divulgação AGRO 556 nº 6. MADRP, Lisboa, Novembro.

Sousa MB, Curado T, Negrão e Vasconcellos, F, Trigo MJ (2007) Mirtilo: Qualidade Pós-Colheita. Edição no âmbito do Projeto PO AGRO DE&D Nº 556. Folhas de divulgação AGRO 556 nº 8. MADRP, Lisboa, Novembro.

Spagolla LC, Santos MM, Passos LML, Aguiar CL (2009) Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de mirtilo “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 30, 2, 59-64.

Spranger-Garcia MI, Belchior AO, Leandro MC, Santos, C (1990) Estabilidade físico-química e biológica de concentrados de pigmentos antocianicos obtidos de bagaço de uva. Ciência Técnica Vitivinícola, 9, 143-159.

Su M-S, Chien P-J (2007) Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. Food Chemistry, 104, 182-187.

Sun J, Chu Y-F, Wu X, Liu RH (2002) Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. Journal of the Agricultural and Food Chemistry, 50, 7449-7454.

Sun B, Leandro MC, de Freitas V & Spranger MI (2006) Fractionation of red wine polyphenols by solid-phase extraction and liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 1128, 27-38.

Vallejo F, Gil-Izquierdo A, Pérez-Vicente A & Garcia-Viguera (2004) *In vitro* gastrointestinal digestión study of brócoli inflorescence phenolic compounds, glucosinolates, and vitamin C. Journal of the Agricultural and Food Chemistry, 52, 135-138.

Vedana MIS, Ziemer C, Miguel OG, Portella AC, Candido LMB (2008) Efeito do processamento na atividade antioxidante de uva. Alimentação e Nutrição, Araraquara, 19, 2, 159-165.

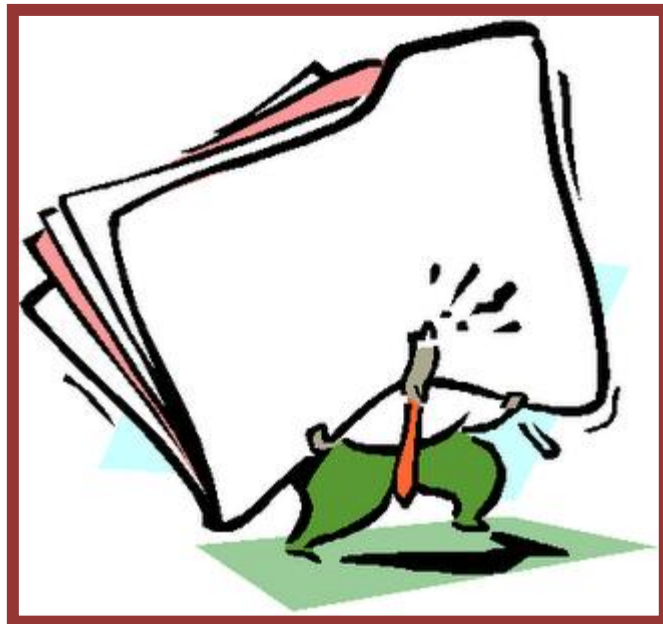
Versari A, Barbanti D, Biesenbruch S, Farnell PJ (1997) Analysis of anthocyanins in red fruits by use of HPLC/spectral array detection. Italian Journal of Food Science 9, 141-148.

Willer H & Yussef M (2000) Organic Agriculture Worldwide. SOL (Stiftung Ökologie & Landbau. Bad Durkheim (Alemanha), 100.

Wu X, Prior R (2005) Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common fruits in the United States: fruits and berries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 2589-2599.

Wu SJ, Tsai JY, Chang SP, Lin DL, Wang SS, Huang SN, Ng LT (2006) Supercritical carbon dioxide extracts exhibits enhanced antioxidant and anti-inflammatory activities of *Physalis peruviana*. Journal of Ethnopharmacology, 108, 407-413.

VI. ANEXOS



ANEXO A

O tratamento estatístico foi feito por recurso ao programa “Statistica” versão 7.0. Foi realizada uma análise de variância (ANOVA 1-fator) seguida de um teste de comparação múltipla (Tukey’s Honestly Significant Difference test) para avaliar se as diferenças eram significativas. A análise estatística foi feita com um nível de significância de 0.05 de probabilidade.

Tabela A 1. Tratamento estatístico dos resultados obtidos para cada um dos frutos estudados, ao longo da maturação.

	CFT me	CFT ac	Ant	Tan	ABTS me	ABTS ac	DPPH met	DPPH ac
F0306	a	ab	a	a	a	a	a	a
F1006	a	b	b	b	a	b	b	b
F1706	b	b	c	c	b	c	a	a
F2406	a	a	d	d	a	a	c	c
F0107	a	a	e	e	a	ab	ac	ac
F0907	c	a	f	e	a	a	ac	ac
G0306	a	a	a	a	a	a	a	a
G1006	b	b	b	b	b	b	b	b
G1706	c	c	c	b	b	b	c	b
G2406	b	d	d	c	b	c	b	c
G0107	d	d	e	d	b	c	d	c
G0907	a	cd	f	c	b	c	b	c
M0306	a	a	a	a	a	a	a	a
M1006								
M1706	b	a	b	a	a	b	b	a
M2406	c	b	c	b	b	c	b	b
M0107	a	a	c	b	b	ab	a	a
M0907	a	a	d	b	c	ab	c	a

