

Sónia da Conceição Andrade

ESTUDO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E
AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM
CAMARINHAS (*COREMA ALBUM* L. D. DON)

Dissertação

Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar



Julho, 2016

Sónia da Conceição Andrade

ESTUDO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E
AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM
CAMARINHAS (*COREMA ALBUM* L. D. DON)

Dissertação

Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar

Trabalho efetuado sob orientação de
Prof. Doutora Raquel Guiné

Trabalho co-orientado por
Prof. Doutor Fernando Gonçalves (ESAV)

Julho, 2016



Dissertação apresentada à
Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viseu
para obtenção do grau de
Mestre em Qualidade e Tecnologia Alimentar

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

AGRADECIMENTOS

Já o pensador Pablo Neruda dizia...*”morre lentamente quem não arrisca o certo pelo incerto para ir atrás de um sonho...”*

Ao longo do nosso processo de crescimento como pessoas, vamo-nos deparando-nos com novas realidades e situações que até então desconhecidas. É preciso percorrer um longo caminho para atingir os nossos objetivos, mas tudo isto não seria possível sem que houvesse a intervenção de todos aqueles que nos rodeiam.

Este trabalho representa o fim de mais uma etapa e o início de outras. Na etapa que agora termina, muitas foram as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para que esta caminhada fosse menos difícil, com palavras de incentivo, com conversas e ideias que me ajudaram a ver a vida de uma forma diferente. A todas elas agradeço e dedico-lhes este trabalho.

No contexto deste trabalho, quero agradecer à Professora Doutora Raquel Guiné, por ter aceitado ser a minha orientadora e desta forma tão prontamente, ter disponibilizado todo o seu apoio para a realização deste trabalho. Ao Professor Doutor Fernando Gonçalves, pela sua disponibilidade, correções e sugestões para a melhoria do trabalho escrito, pelo seu bom sentido de humor, por toda a sua paciência dedicada, pelas suas sugestões, orientação prestada ao longo deste trabalho prático e acima de tudo, o meu sincero obrigada, por todos os seus ensinamentos e conhecimentos transmitidos sobre as técnicas laboratoriais ao longo do meu percurso académico. Ainda no contexto deste trabalho, também quero agradecer ao Engenheiro Rui Coutinho, por toda a sua disponibilidade e ajuda prestada a quando surgia alguma dúvida ou quando ocorria alguma situação mais urgente no laboratório.

Também quero agradecer a Professora Doutora Raquel Guiné e à Professora Doutora Paula Correia por toda a amizade, ajuda, dedicação, confiança, visibilidade e incentivos que me proporcionaram, com a colaboração e participação em diferentes projetos científicos e não científicos.

Quero agradecer às minhas amigas e colegas de laboratório, Solange Oliveira, Ana Beatriz Elvas e Ana Margarida Costa, por toda a ajuda, companhia e acima de tudo, pelos divertidos e bons momentos (que só nós sabemos)

passados no laboratório ao longo destes últimos meses. Sem elas nada teria sido igual e tenho a certeza que teria sido tudo mais difícil. O meu obrigada especial à Solange Oliveira por todo o companheirismo, apoio e ajuda prestada no laboratório e no dia-a-dia ao longo destes meses. À Ana Patrícia pelos conselhos e apoio através de palavras de incentivo nesta etapa final.

Também quero agradecer a todos os meus amigos verdadeiros, por todo o seu apoio, carinho e paciência prestados durante estes anos tanto no percurso pessoal; como no académico. Em especial à Eduarda Nabais e ao Daniel pela ajuda, companhia e tempo disponibilizado naquela visitinha de campo à Costa Nova; à Ana Martins, Sara Lopes, Joana Lopes, Filipa Ferraz, Rita Ferreira, Laura Reinas, Tânia Santos, Ana Mesquita, Márcia Gonçalves, e António Figueiredo por toda a amizade e apoio demonstrado, à Andreia Pina e sua família e ao meu mais recente amigo Fábio Lucas pelo carinho, apoio, pelas palavras de otimismo e incentivo nos momentos mais sensíveis e de maior tensão.

Por fim, quero deixar aqui o meu agradecimento, às pessoas mais importantes da minha vida, a minha família, pois ela foi e continua a ser a base responsável pela pessoa que hoje me tornei. Quero agradecer-lhes pelo seu infinito carinho, apoio, compreensão e incentivo que sempre me deram para nunca desistir dos meus objetivos e para nunca deixar de acreditar. Em especial à minha mãe, pessoa mais especial na minha vida, à minha irmã mais velha por tudo o que tem feito por mim, por tudo que me ajudou e ainda continua a ajudar, ao meu pai, à minha irmã do meio, ao meu irmão, cunhados, sobrinhos e restante família.

E a Ti, Deus por me teres dado forças para chegar até aqui, não me deixando desistir.

INFINITOS OBRIGADAS a TODOS!!!!

RESUMO

As camarinhas (*Corema album* L. D. Don) são pequenos frutos selvagens que se desenvolvem em arbustos dunares ao longo das costas da Península Ibérica. Apesar de serem ainda pouco conhecidas, as camarinhas são pequenos frutos que podem pertencer ao vasto grupo dos frutos vermelhos, vulgarmente conhecidos pelos seus efeitos benéficos na saúde. Desta forma, neste estudo foram realizadas várias análises às camarinhas no que respeita a propriedades de natureza física e química e em particular a alguns compostos com efeitos bioativos.

Com a realização deste trabalho pretendeu-se avaliar as propriedades físico-químicas das camarinhas, bem como dos compostos bioativos com potenciais benefícios para a saúde. Nesse sentido, as bagas de camarinha foram avaliadas quanto às suas propriedades físicas (dimensões, peso, cor e textura), propriedades químicas (humidade, acidez, °Brix, fibra, açúcares totais, açúcares redutores e vitamina C) e propriedades fenólicas (compostos fenólicos totais, orto-difenóis, flavonóides, taninos e atividade antioxidante, por DPPH e ABTS), em diferentes extratos de amostras de polpas e de grainhas liofilizadas. Os primeiros extratos ainda foram submetidos a uma simulação das condições do trato digestivo, para avaliar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante. Este trabalho teve ainda como objetivo conhecer a bioacessibilidade dos compostos fenólicos totais e da sua atividade antioxidante, através do método da simulação “*in vitro*” das diferentes etapas do trato gastrointestinal.

No que diz respeito às propriedades físicas analisadas, as camarinhas frescas demonstraram uma altura média de 8,6 mm, um diâmetro médio de 9,4 mm e uma massa média de 0,7 g. Relativamente à caracterização da cor, estas apresentavam uma cor clara ($L^*=79,8$). Quanto à textura apresentaram alguma elasticidade média (2,9 mm) e uma baixa dureza (1,9 N).

Nas análises químicas as camarinhas revelaram ser compostas, maioritariamente, por água (87,9%), por açúcares totais e fibras. Para além disso, apresentavam um teor em sólidos solúveis totais de 6,3 °Brix, uma acidez de 1,4 g ácido tartárico/100 g e um teor de vitamina C de 2,8 mg de ácido ascórbico/100 g.

Na quantificação dos compostos fenólicos totais e flavonóides, os extratos de acetona:água das amostras de polpas de camarinha branca apresentaram os valores mais elevados, 1614,1 mg EAG/100 g e 143,7 mg EQ/100 g, respetivamente. Relativamente à quantificação dos orto-difenóis e dos taninos os extratos de metanol e de acetona:água das amostras de grainhas de camarinha branca registaram os valores de 23,4 mg EAG/100 g e 915,7 mg/100 g, respetivamente. Na atividade antioxidante por DPPH e ABTS os extratos de acetona:água das amostras de polpas de camarinha branca apresentaram, respetivamente, os valores de 40,1 $\mu\text{mol ET/g}$ e de 79,6 $\mu\text{mol ET/g}$.

Na avaliação da bioacessibilidade verificou-se que ocorreu uma maior percentagem de compostos fenólicos disponíveis para absorção e uma maior preservação da sua atividade antioxidante nos extratos das grainhas, comparativamente aos extratos das polpas.

Com este estudo concluiu-se que as camarinhas são pequenos frutos portadores de um grande potencial em diversos compostos bioativos benéficos para a saúde dos consumidores.

Palavras-chave: Camarinhas, grainhas, compostos bioativos e bioacessibilidade..

ABSTRACT

The “camarinhas”, designated as Portuguese crowberry (*Corema album* L., D. Don) are wild small fruits that grow on bushes on the dunes of the Iberian Peninsula coasts. Although they are still little known, the Portuguese crowberries are small fruits that may belong to the big group of red fruits, commonly known by its beneficial health effects. Thus, in this study, were made some analyses to physical and chemical properties, and particularly compounds with bioactive effects.

With this work it was aimed to evaluate the physical and chemical properties of camarinhas and of bioactive compounds with potential health benefits. In this sense, the berries “camarinhas” were evaluated for their physical properties (size, weight, color and texture), chemical properties (moisture, acidity, Brix, fiber, total sugars, reducing sugars and vitamin C) and phenolic properties (total phenolic compounds, ortho-diphenols, flavonoids, tannins and antioxidant activity by DPPH and ABTS methods) in different extracts from lyophilized samples of pulps and seeds. The first extract was further subjected to a simulation of the conditions of the digestive tract, to evaluate bioaccessibility of phenolics and antioxidant activity. This study also aimed to assess the bioaccessibility of total phenolic compounds and their antioxidant activity through the “*in vitro*” simulation method of the different stages of the gastrointestinal tract.

With respect to physical properties analysed in fresh Portuguese crowberries, they had an average height of 8.6 mm, an average diameter of 9.4 mm and an average weight of 0.7 g. With regard to color characterization, they were clear had color ($L^*=79.8$). Regarding the texture, they exhibited a considerable elasticity (2.9 mm) and low hardness (1.9 N).

Chemical analyses showed that the Portuguese crowberries are composed mainly by water (87.9%), by total sugars and fibers. Furthermore they had a solids soluble content of 6.3 °Brix, an acidity of 1.4 g tartaric acid/100 g and vitamin C content of 2.8 mg ascorbic acid/100 g.

In quantification of total phenolics and flavanoids in the acetone:water extracts samples of white Portuguese crowberry pulps showed the values of 1614.1 mg GAE/100 g and 143.7 mg EQ/100 g, respectively. For the

quantification of ortho-diphenols and tannins in extracts of methanol and acetone:water the samples of white Portuguese crowberry seeds had the values of 23.4 mg GAE/100 g and 915.7 mg/100 g, respectively. The antioxidant activity by DPPH and ABTS in the acetone:water extracts of the samples of white Portuguese crowberry pulps had respectively the values of 40.1 $\mu\text{mol ET/g}$ and 79.6 $\mu\text{mol ET/g}$.

In the evaluation of bioaccessibility it was found that there was a higher percentage of phenolics available for absorption and a larger preservation of its antioxidant activity in the extracts of seeds compared to the extracts of pulps.

With this study it was concluded that the Portuguese crowberries have higher potential for many bioactive compounds beneficial for the health of consumers.

Key-words: Portuguese crowberry, seeds, physicochemical properties, bioactive compounds and bioaccessibility.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract	V
Índice Geral	VII
Índice de tabelas	XIV
Lista de Abreviaturas.....	XV
<i>CAPÍTULO I</i> : Introdução.....	1
Enquadramento geral	2
Objetivos	3
Revisão Bibliográfica.....	4
1.1. Camarinhas - <i>Corema album</i> L D. Don.....	4
1.1.1. Espécie e caraterização	4
1.1.2. Distribuição Geográfica da <i>Corema album</i>	5
1.1.3. Caraterização da Área Geográfica em estudo.....	6
1.2. Morfologia e caraterização das camarinhas.....	8
1.3. Produção e comercialização das camarinhas em Portugal.....	8
1.4. Propriedades físico-químicas e nutricionais dos pequenos frutos	10
1.4.1. Propriedades físicas.....	10
1.4.2. Propriedades químicas, nutricionais e sensoriais	10
1.5. Composição fenólica dos pequenos frutos	11
1.5.1. Compostos fenólicos.....	12
1.5.1.1. Não flavonóides	13
1.5.1.2. Flavonóides.....	15

1.5.2. Atividade antioxidante e protetora dos compostos fenólicos.....	17
1.5.3. Bioacessibilidade dos compostos fenólicos	18
CAPÍTULO II: Parte Experimental	19
2.1. Amostras	20
2.2. Caracterização física das camarinhas	21
2.2.1. Peso e dimensões.....	21
2.2.2. Cor	21
2.2.3. Textura.....	23
2.3. Caracterização química das camarinhas	24
2.3.1. Determinação da humidade	24
2.3.3. Determinação da acidez titulável	25
2.3.4. Determinação do teor de sólidos solúveis.....	26
2.3.5. Determinação do teor de açúcares totais e redutores.....	27
2.3.6. Determinação do teor de vitamina C.....	28
2.4. Preparação dos extratos	29
2.4.1. Métodos de extração dos componentes fenólicos das camarinhas .	29
2.4.2. Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	32
2.4.3. Determinação do teor de orto-difenóis	33
2.4.4. Determinação do teor de flavonóides.....	34
2.4.5. Determinação do teor de taninos totais.....	35
2.4.6. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH.....	35
2.4.7. Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS	37
2.5. Simulação “ <i>in vitro</i> ” das condições do trato gastrointestinal	38
2.6. Tratamento dos dados	39
CAPÍTULO III: Resultados e Discussão	40
3.1. Propriedades físico-químicas das camarinhas.....	41

3.1.1. Determinação das características biométricas.....	41
3.1.2. Determinação da cor.....	42
3.1.2. Determinação da textura.....	42
3.1.3. Caracterização química das camarinhas.....	43
3.2. Compostos fenólicos totais.....	44
3.2.1. Orto- difenóis.....	47
3.2.2. Flavonóides.....	49
3.2.3. Taninos.....	52
3.3. Atividade antioxidante.....	54
3.3.1. Método DPPH.....	54
3.3.2. Método ABTS.....	57
3.3.2. Correlação entre a atividade antioxidante e os compostos fenólicos totais.....	59
3.4. Bioacessibilidade “ <i>in vitro</i> ”.....	62
3.4.1. Compostos fenólicos totais.....	62
3.4.2. Atividade antioxidante por ABTS.....	65
<i>CAPITULO IV: Conclusões.....</i>	<i>68</i>
<i>CAPITULO V: Referências Bibliográficas.....</i>	<i>68</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Inflorescência da <i>Corema album</i> : (a) masculina; (b) feminina; (c) hermafrodita; (d) bagas (adaptado Costa, 2011).	5
Figura 2: Distribuição da espécie <i>Corema album</i> na Península Ibéria. Adaptado de Zunzunegui (2005).....	6
Figura 3: Imagens da praia de Mira.....	7
Figura 4: Comercialização das camarinhas.....	9
Figura 5: Vários produtos derivados das camarinhas.....	9
Figura 6: Classificação dos compostos fenólicos nas diversas subclasses (adaptado de Oliveira, 2014).	13
Figura 7: Estruturas básicas dos ácidos hidrobenzóicos e hidroxinâmicos (adaptado de Garrido & Borges, 2013).....	13
Figura 8: Estrutura do ácido elágico (A) e ácido gálico (B) (adaptado de Oliveira, 2014)	14
Figura 9: Estruturas químicas dos flavonoides (adaptado de Semedo, 2012).....	15
Figura 10: Classificação dos antioxidantes (adaptado de Oliveira, 2015).	17
Figura 11: Esquema referente à divisão da amostragem colhida.....	20
Figura 12: Espaço de cor Hunter Lab (esquerda) e parâmetros de tonalidade (h°) (direita).....	22
Figura 13: Exemplo de uma curva típica da força-distância no teste de perfuração da camarinha.....	24
Figura 14: Curva de calibração da vitamina C.	29
Figura 15: Curva de calibração dos compostos fenólicos.	32
Figura 16: Curva de calibração do orto-difenóis.	33

Figura 17: Curva de calibração dos flavonóides.	34
Figura 18: Curva de calibração da atividade antioxidante pelo método DPPH.	36
Figura 19: Curva de calibração da atividade antioxidante pelo método ABTS.	38
Figura 20: Compostos fenólicos totais obtidos nas duas extrações (CFT - compostos fenólicos totais; EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).	44
Figura 21: Quantidade de compostos fenólicos totais consoante o tipo de solvente (EAG - Equivalentes de ácido gálico; CFT - compostos fenólicos totais; EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).	45
Figura 22: Orto-difenóis obtidos nas duas extrações (EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).	47
Figura 23: Quantidade de orto-difenóis consoante o tipo de solvente (EAG - Equivalentes de ácido gálico; EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).	48
Figura 24: Flavonóides obtidos nas duas extrações (EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).	49

Figura 25: Quantidade de flavonóides consoante o tipo de solvente (EQ - Equivalentes de Quercitina; EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).....50

Figura 26: Taninos obtidos nas duas extrações (EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).....52

Figura 27: Quantidade de taninos consoante o tipo de solvente (EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).53

Figura 28: Atividade antioxidante pelo método DPPH resultante das duas extrações (EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).....54

Figura 29: Valores da atividade antioxidante pelo método DPPH resultante do tipo de solvente (ET - Equivalentes de trolox; EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).55

Figura 30: Atividade antioxidante pelo método ABTS resultante das duas extrações (EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).....57

Figura 31: Valor da atividade antioxidante pelo método ABTS resultante do tipo de solvente (ET - Equivalentes de trolox; EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).....58

Figura 32: Reta de correlação ente a atividade antioxidante pelo método DPPH e o teor em compostos fenólicos.59

Figura 33: Reta de correlação entre a Atividade Antioxidante pelo método ABTS e o teor de compostos fenólicos.60

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Descrição e codificação atribuída a cada extração realizada nas camarinhas.....	31
Tabela 2: Características biométricas das camarinhas.	41
Tabela 3: Parâmetros avaliados da cor.	42
Tabela 4: Parâmetros avaliados para textura das camarinhas.....	42
Tabela 5: Resultados das análises químicas às camarinhas.....	43
Tabela 6: Valores de correlação da Atividade Antioxidante obtidos consoante as componentes fenólicas (EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol).	61
Tabela 7: Percentagem de compostos fenólicos totais disponíveis em cada etapa do trato gastrointestinal (EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).....	62
Tabela 8: Percentagem de perda dos compostos fenólicos por tipo de extração (EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).....	64
Tabela 9: Percentagem da atividade antioxidante, por ABTS disponível em cada etapa do trato gastrointestinal (EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).....	65
Tabela 10: Percentagem de perda da atividade antioxidante por tipo de extração (EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - Atividade Antioxidante;

ABTS - 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico);

AcAg - Solução acetona:água 50%;

AVC – Acidente Vascular Cerebral;

C – Chroma;

CFT- Compostos Fenólicos Totais;

D – Diâmetro;

DIP - 2,6-dicloroindofenol;

DPPH- 2,2-difenil-1-picrilhidrazila;

EAG – Equivalentes de Ácido Gálico;

ET – Equivalentes de Trolox;

EQ – Equivalentes de Quercitina;

EtAg - Solução etanol:água a 50 %;

GCB - Grainhas Camarinha Branca;

GCT - Grainhas Camarinha Translúcida.

GP - Grau de polimerização;

INE – Instituto Nacional Estatística;

H – Altura;

HIV/SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida;

h° - Tonalidade;

Me - Metanol a 100%;

NP - Norma Portuguesa;

PCB - Polpa Camarinha Branca;

PCT - Polpa Camarinha Translúcida;


RAS - Espécies reativas de azoto;

ROS - Espécies reativas de oxigénio;

TAc – Acidez Titulável;

TPA - Texture Profile Analysis;

TSS - Teor de Sólidos Solúveis.

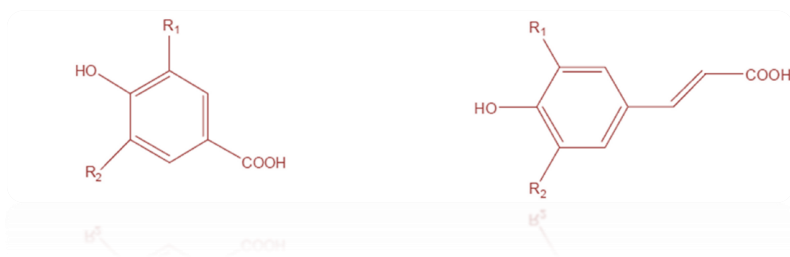


*"Camarinha.
Esse pequeno grande arbusto
Que vive a olhar o mar.
Algo rubro pelo Natal e Ano Novo,
Ornado de pérolas pelo fim da Primavera,
Mas sempre, sempre verdejante
Contra a brancura das areias e os azuis do céu e mar".*

Catarina A. Costa



CAPÍTULO I : INTRODUÇÃO



ENQUADRAMENTO GERAL

As camarinhas (*Corema album* L.D. Don) desenvolvem-se em arbustos dunares em zonas costeiras de forma selvagem (León-González *et al.*, 2012). Embora estas sirvam regularmente de alimento para animais (Oliveira & Dale 2012), estas também são próprias para o consumo humano (León-González *et al.*, 2012), podendo ser consumidas ao natural, como aperitivo, ou então transformadas/processadas sob a forma de biscoitos, limonadas, geleias e licores (León-González *et al.*, 2013).

As camarinhas são pequenos frutos, de cor branca ou rosada e com uma forma esférica (Santos *et al.*, 2009). Estas possuem uma polpa muito rica em água e um sabor muito agradável, levemente ácido (Oliveira & Dale, 2012).

A ação dos compostos antioxidantes está relacionada, com a prevenção de efeitos oxidativos que levam ao aparecimento de diversas doenças crónicas e degenerativas (Chia-Jung, 2013). Os compostos bioativos das camarinhas podem estar correlacionados com a presença de determinados fitoquímicos, tais como os flavonóides e ácidos fenólicos (León-González *et al.*, 2012 e 2013). Estes compostos têm despertado interesse pelos seus efeitos biológicos e benéficos na saúde, provenientes de uma ação antioxidante e atuando, desta forma, como agentes de defesa contra os radicais livres (Sánchez-Salcedo *et al.*, 2015).

Em Portugal, a produção extensiva das camarinhas é uma prática que não existe, devido às condições próprias e necessárias para o crescimento e desenvolvimento desta espécie (Costa, 2011; Oliveira & Dale, 2012).

No que diz respeito à comercialização, as camarinhas não têm um nicho de mercado organizado, comparativamente com outros pequenos frutos (mirtilos, groselhas, framboesas, entre outros). No entanto, a geleia de camarinhas começa a despertar um crescente interesse, em mercados internacionais, o que intensifica a importância de adquirir um maior conhecimento sobre estes novos pequenos frutos.

Dada a importância que se faz sentir perante as camarinhas foram determinadas diferentes propriedades físico-químicas e feita a uma avaliação dos compostos bioativos, em polpas e em grainhas em dois graus diferentes de maturação.

OBJETIVOS

Com a realização deste trabalho pretendeu-se avaliar as propriedades físico-químicas das camarinhas, bem como dos compostos bioativos com potenciais benefícios para a saúde. Nesse sentido, as bagas de camarinha foram avaliadas quanto às suas propriedades físicas (dimensões, peso, cor e textura), propriedades químicas (humidade, acidez, °Brix, fibra, açúcares totais, açúcares redutores e vitamina C) e propriedades fenólicas (compostos fenólicos totais, orto-difenóis, flavonóides, taninos e atividade antioxidante, por DPPH e ABTS).

Este trabalho teve ainda como objetivo conhecer a bioacessibilidade dos compostos fenólicos totais e da sua atividade antioxidante, através do método da simulação “*in vitro*” das diferentes etapas do trato gastrointestinal.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Camarinhas - *Corema album* L D. Don

As camarinhas são pequenos frutos que se desenvolvem nos arbustos selvagens da *Corema album* L.D. Don. A *Corema album* L.D. Don (*Empetraceae*) é uma das espécies mais importantes dos sistemas dunares do ocidente. Esta espécie endêmica é um arbusto dioico adaptada a solos arenoso e encontra-se localizada na costa atlântica da Península Ibérica (Marques, 2007; Oliveira & Dale, 2012; Guitián *et al.*, 1997).

1.1.1. Espécie e caraterização

O nome *Corema* tem uma origem grega (“Korema”), que significa “vassoura”. Este nome reflete uma das principais funções atribuídas aos ramos destes arbustos, ao longo de várias décadas (Gil-López, 2011). Atualmente esta espécie encontra-se em extinção, devido à elevada degradação ou destruição dos habitats costeiros (Calviño-Cancela, 2005).

A *Corema album* L.D. Don é um arbusto dioico que pertence à família das *Empetraceaes* tem a particularidade de adquirir comportamentos típicos das espécies subdióicas, quando os arbustos do sexo masculino desenvolvem inflorescências características das plantas hermafroditas (Zunzunegui *et al.*, 2005). Por esta razão, por vezes, torna-se difícil encontrar um mecanismo adequado para a determinação do sexo desta espécie (Álvarez-Cansino *et al.*, 2010).

Os arbustos desta espécie são caraterizados por apresentarem uma estatura baixa (30-75 cm) e numerosos ramos sempre verdes (Oliveira & Dale 2012). Os arbustos do sexo feminino tendem a criar estratégias de adaptação que os diferenciem dos arbustos do sexo masculino. Essas estratégias são evidenciadas na morfologia e fisiologia desta espécie e, neste sentido os ramos dos arbustos do sexo feminino são caracterizados como curtos e curvilíneos e os do sexo masculino como longos e eretos (Zunzunegui *et al.*, 2005).

As flores dos arbustos do sexo masculino (Figura 1 (a)) são constituídas por três sépalas, com três pétalas vermelhas. Por outro lado, as flores dos arbustos do sexo feminino (Figura 1 (b)) apresentam as mesmas características morfológicas, no entanto com menores dimensões (Zunzunegui *et al.*, 2005).



Figura 1: Inflorescência da *Corema album* : (a) masculina; (b) feminina; (c) hermafrodita; (d) bagas (adaptado Costa, 2011).

O período de inflorescência desta espécie decorre de fevereiro a abril. Após esse período, os arbustos do sexo feminino começam a produzir pequenos frutos esféricos semelhantes a bagas (Costa, 2011; Álvarez-Cansino *et al.*, 2012).

A maturação destes frutos, em Portugal, tem início durante o verão, entre os meses de junho a julho nas regiões costeiras a sul e de agosto a setembro nas regiões costeiras mais a norte (Álvarez-Cansino *et al.*, 2012; Oliveira & Dale, 2012). O pico de maturação decorre normalmente, entre agosto e setembro (Pimpão *et al.* 2013), no entanto as camarinhas podem permanecer nos arbustos até outubro ou dezembro, dependendo da zona geográfica onde se encontrem localizadas (Larrinaga, 2009; Álvarez-Cansino *et al.*, 2012).

1.1.2. Distribuição Geográfica da *Corema album*

A espécie *Corema album* L.D. Don desenvolve-se ao longo da costa atlântica da Península Ibérica em habitats costeiros, como falésias, pinhais e

dunas (Hellmann *et al.*, 2011). Por outro lado, no caso da subespécie *C. album* subsp. *Azoricum* Pinto da Silva do Arquipélago dos Açores, esta desenvolve-se em locais rochosos e em campos de lava ou de cinza vulcânica (Calviño-Cancela, 2004).

As populações mais importantes desta espécie, em Portugal (Figura 2), encontram-se distribuídas a sudoeste (Sines a Tróia) e a norte-centro (Nazaré a Ovar) (Oliveira & Dale, 2012). Em contra partida, em Espanha as populações mais importantes encontram-se localizadas em Aspeillo, a oeste do Parque Nacional de Doñana (Zunzunegui *et al.*, 2005).

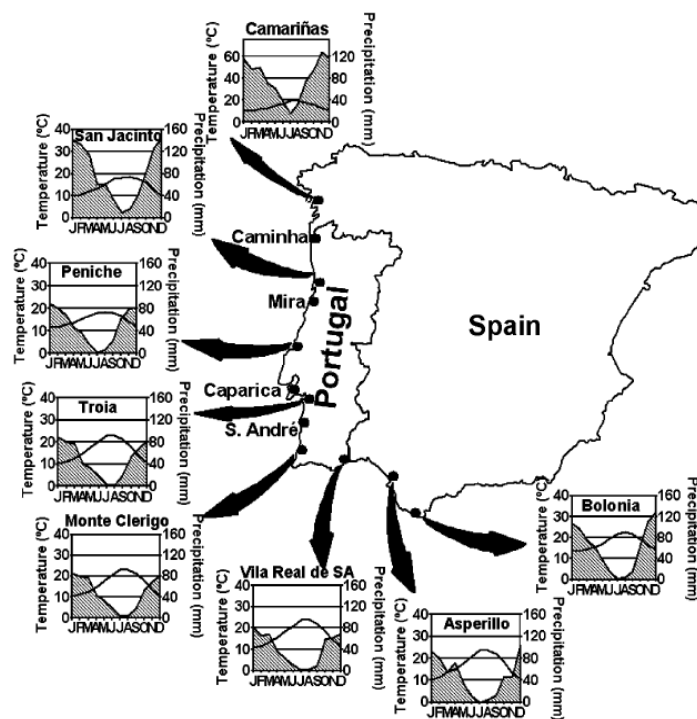


Figura 2: Distribuição da espécie *Corema album* na Península Ibérica. Adaptado de Zunzunegui (2005).

1.1.3. Caraterização da Área Geográfica em estudo

As dunas da praia de Mira pertencem à Região Centro (NUT II) do distrito de Coimbra e ocupam uma área total de 124,1 Km² (INE, 2016). O concelho de Mira é composto por quatro freguesias (Mira, Praia de Mira, Seixo e Carapelhos).

A praia de Mira (Figura 3) é formada por uma faixa litoral aplanada, constituída por areia e um cordão dunar com orientação de norte para o sul.



Figura 3: Imagens da praia de Mira.

Os meios dunares são de difícil sobrevivência para algumas espécies de plantas, pois a disponibilidade de água é fraca e o teor em elementos nutritivos e essenciais é escasso (Ferreira, 2013).

As espécies dunares apresentam uma grande resistência a diversos fatores relacionados com as condições edafoclimáticas, tais como, a instabilidade térmica, ventos fortes carregados de partículas de sal e solos de drenagem rápida e com baixa disponibilidade em matéria orgânica (Alvarez-Cansino *et al.*, 2010; Ferreira, 2013).

O clima da região da praia de Mira é caracterizado por apresentar um inverno com temperaturas baixas e um verão seco e pouco quente, embora de longa duração. O concelho de Mira, de forma geral, no verão apresenta uma temperatura máxima de 24,5 °C, (mês de agosto) e uma mínima de 4,2 °C, (mês de janeiro). A temperatura média anual ronda os 14,1 °C.

1.2. Morfologia e caracterização das camarinhas

As camarinhas são pequenos frutos de cor branca ou rosada a translúcida (León-González *et al.*, 2013). Morfologicamente, as camarinhas têm uma forma esférica e compreendem uma largura de 6-12 mm, um comprimento 5-12 mm e um diâmetro entre 5-8 mm (Alvarez-Cansino *et al.*, 2010; Oliveira & Dale, 2012).

O interior destes frutos é constituído por polpa e habitualmente três grainhas (sementes) (Calviño-Cancela, 2002). No entanto, devido às variações do genótipo, as camarinhas podem conter duas a nove grainhas (Costa, 2011). Estas grainhas são descritas como sendo alongadas, de espessura grossa e com um endocarpo duro e lenhoso (Larrinaga, 2009; Zunzunegui *et al.*, 2005).

1.3. Produção e comercialização das camarinhas em Portugal

A produção extensiva das camarinhas ainda é uma prática não realizável, talvez devido às condições particulares e propícias dos solos dunares e às condições edafoclimáticas das regiões onde estes tipos de frutos se desenvolvem. No entanto, já existem estudos direcionados à investigação cujo objetivo passa por criar condições controladas para a reprodução desta espécie (Costa, 2011; Oliveira & Dale, 2012).

Atualmente, ao contrário de outros pequenos frutos, as camarinhas não são comercializadas nas grandes cadeias de distribuição do setor Agroalimentar. Apesar de não existirem dados do Instituto Nacional Estatística (INE) ou de outras entidades, durante décadas as camarinhas foram vendidas em mercados (Figura 4) das zonas costeiras portuguesas. Na atualidade, este hábito mantém-se, sendo ainda, a única forma de comercialização (León-González *et al.*, 2013). As camarinhas são vendidas “avulso” utilizando para o efeito copos de plástico ou vidro como forma de “medida”. O valor destas pode variar entre 0,50 cêntimos a 1 euro, dependendo do tamanho do copo ou então das camarinhas.



Figura 4: Comercialização das camarinhas.

As camarinhas são consumidas, frequentemente, ao natural como aperitivo, ou então transformadas/processadas sob a forma de biscoitos, limonadas, geleias e licores (Figura 5) (León-González et al., 2013).



Figura 5: Vários produtos derivados das camarinhas.

Artigos recentemente publicados em revistas do setor alimentar, referem que a geleia de camarinha é um produto com um “sabor único que já levou, inclusive, a despertar muito interesse em grandes nomes de chefes da cozinha internacional, um pouco por todo o Mundo (Amesterdão, Barcelona, Belo Horizonte, Londres e Paris)” (Anónimo, 2015),

1.4. Propriedades físico-químicas e nutricionais dos pequenos frutos

A caracterização química e física dos pequenos frutos e a quantificação dos seus componentes tem atraído o interesse da comunidade científica, sendo estas essenciais para a compreensão do seu valor nutricional.

1.4.1. Propriedades físicas

As propriedades físicas, incluindo o estudo biométrico, representam um fator de enorme importância na caracterização dos pequenos frutos, pois estas podem indicar as diferenças existentes numa dada variabilidade, dentro da mesma população ou então entre populações da mesma espécie (Zuffo *et al.*, 2014).

A textura nos pequenos frutos é definida como sendo um padrão da qualidade, interligada a um conjunto de características intrínsecas com evidências claras de suculência, firmeza e dureza (Ferreira, 2015).

A cor resulta de um conjunto de pigmentos naturais presentes nos frutos e vegetais, dos quais, são classificados como corantes lipossolúveis e hidrossolúveis. Os corantes lipossolúveis estão presente nas clorofilas (verde) e nos carotenóides (amarelo, laranja e vermelho). Os hidrossolúveis encontram-se presentes nas antocianinas (vermelho, azul) e nos flavonóides (amarelo) (Ferreira, 2015).

1.4.2. Propriedades químicas, nutricionais e sensoriais

Os pequenos frutos contêm macronutrientes e micronutrientes, incluindo fibras, minerais, vitaminas e compostos bioativos (Jeong *et al.*, 2014; Charoenkiatkul *et al.*, 2016).

A porção comestível destes frutos é constituída maioritariamente por água (cerca de 80%) e por hidratos de carbono. A água é uma molécula que possui a capacidade de unir-se a outras substâncias, tais como açúcares, taninos, pigmentos, sais minerais, ácidos, entre outros. Os hidratos de carbono podem ser classificados em monossacarídeos, quando constituídos por uma molécula, oligossacarídeos (compostos por 2 a 9 monossacarídeos), ou então

polissacarídeos (compostos por 10 ou mais monossacarídeos). A glucose, frutose e sacarose constituem os principais açúcares encontrados nos frutos (Barros, 2012).

As vitaminas e minerais são micronutrientes que, para além de desempenham um papel nutricional e fisiológico importante, cooperam no aroma, textura e na ativação/inibição de determinadas reações enzimáticas. As vitaminas são obtidas essencialmente através da alimentação, com exceção das vitaminas B, D e K, as quais podem ser sintetizadas pelo organismo. No caso particular da vitamina C (ácido ascórbico), esta desempenha funções como conservante, estabilizador antioxidante, entre outras (Barros, 2012).

A composição físico-química das camarinhas é um tema pouco estudado, no entanto segundo alguns estudos, já realizados, descrevem estes pequenos como sendo portadores de um sabor doce levemente ácido, semelhante a mel e a limão, muito ricos em água, açúcares e fibras. Estas também são portadoras de uma importante fonte em vitamina C e fitoquímicos, nomeadamente, ácidos fenólicos e flavonóides (Cancela, 2002; León-González *et al.*, 2012; Pimpão *et al.* 2012; Santos *et al.*, 2014).

Os compostos bioativos naturais denominados “fitoquímicos” ou “fito nutrientes”, detêm de um papel importante numa alimentação equilibrada. Estes compostos orgânicos, biologicamente ativos, são os que conferem a cor, o sabor, o aroma e a proteção às plantas (Du *et al.*, 2014).

1.5. Composição fenólica dos pequenos frutos

Os pequenos frutos são amplamente conhecidos por conterem grandes quantidades em compostos fenólicos. Os compostos bioativos, presentes nestes frutos, abrangem substâncias nutricionais e não nutricionais, que detêm uma ação metabólica ou fisiológica específica, melhorando as condições de saúde, promovendo o bem-estar e prevenindo o surgimento precoce de algumas doenças degenerativas (Jeong *et al.*, 2014). Segundo as indicações de vários estudos, o consumo destes frutos pode promover efeitos benéficos sobre a saúde humana, atuando como agentes antibacterianos, anti-inflamatórios e anticancerígenos (León-González *et al.* 2013; Jeong *et al.*, 2014).

1.5.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são os produtos resultantes do metabolismo secundário, provenientes das diferentes reações de defesa das plantas contra as agressões ambientais (Kylli, 2010). Estes compostos fazem parte de um vasto grupo de fitoquímicos derivados de fenilalanina, contendo apenas um ou mais grupos hidroxilo ligados a um anel benzénico (Garcia-Salas *et al.*, 2010).

Os orto-difenóis são compostos fenólicos resultantes das reações de hidroxilação dos monofenóis procedentes, da primeira fase da reação enzimática da polifenoloxidase (enzima intracelular) (Fronk *et al.*, 2015). A hidroxilação dos compostos fenólicos na posição orto do anel B (orto-difenol), proporciona aos frutos uma elevada capacidade antioxidante (Roussos *et al.*, 2009). Por outro lado, as orto-quinonas são resultantes da oxidação dos orto-difenóis (Fronk *et al.*, 2015).

Os compostos fenólicos podem ser agrupados em diferentes classes e subclasses (Figura 6) de acordo com a sua estrutura química básica ou então com o tipo de ligações. Estes compostos podem ser encontrados ligados a açúcares ou então a derivados funcionais, tais como, ésteres ou ésteres metílicos (Garcia-Salas *et al.*, 2010).

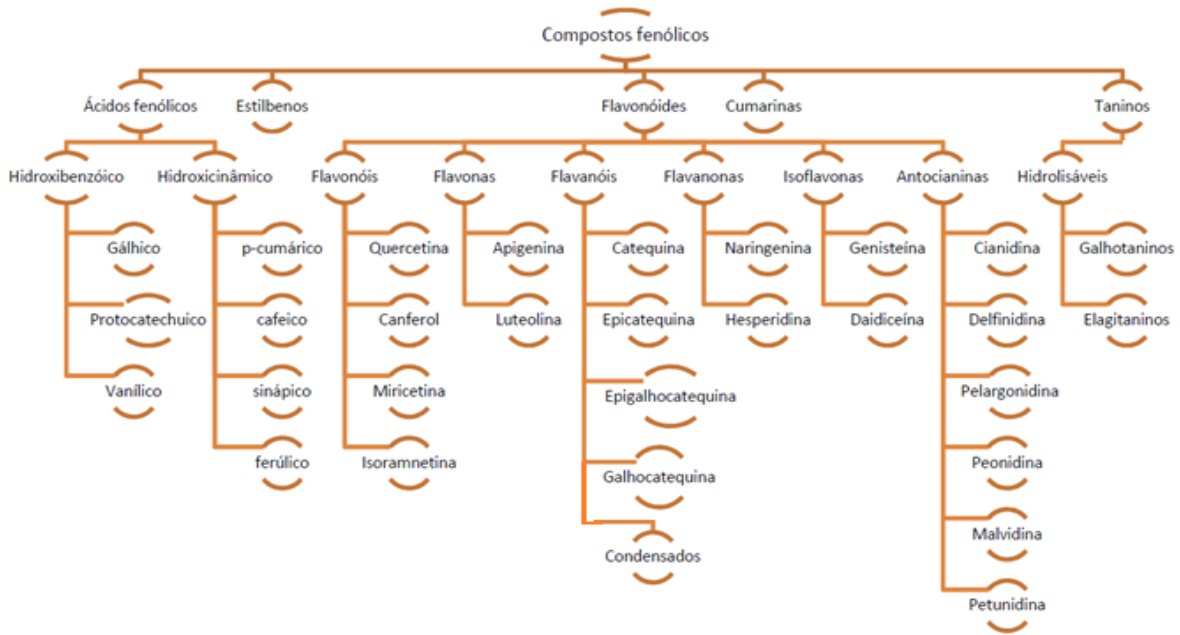
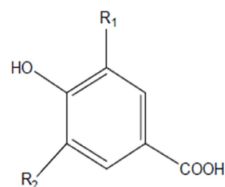


Figura 6: Classificação dos compostos fenólicos nas diversas subclasses (adaptado de Oliveira, 2014).

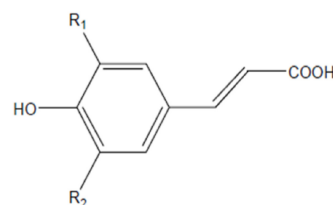
Os compostos fenólicos podem ser divididos em compostos flavonóides (polifenóis) e não-flavonóides. Os principais representantes destes compostos são os flavonóides (C6-C3-C6), subdivididos em flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianinas e isoflavonas. Os não-flavonóides subdividem-se em ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos ou ácidos hidroxicinâmicos), estilbenos (C6-C2-C6), cumarinas (C6-C3) e taninos hidrolisáveis e complexos (Oliveira, 2014).

1.5.1.1. Não flavonóides

Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos principais: ácidos hidroxibenzóicos (Figura 7), contendo 7 átomos de carbono (C6-C1) e ácidos hidroxicinâmicos (Figura 7), com 9 átomos de carbono (C6-C3).



Ácido *p*-hidroxibenzóico $R_1=R_2=H$
 Ácido protocatechuico $R_1=OH$ $R_2=H$
 Ácido vanílico $R_1=OCH_3$ $R_2=H$
 Ácido siríngico $R_1=R_2=OCH_3$



Ácido cumárico $R_1=R_2=H$
 Ácido cafeico $R_1=OH$ $R_2=H$
 Ácido ferúlico $R_1=OCH_3$ $R_2=H$
 Ácido sinápico $R_1=R_2=OCH_3$

Figura 7: Estruturas básicas dos ácidos hidrobenzóicos e hidroxicinâmicos (adaptado de Garrido & Borges, 2013).

Os ácidos hidroxibenzoicos resultam diretamente do ácido benzoico. Estes ácidos encontram-se, normalmente, ligados a açúcares ou então a ácidos orgânicos (Kylli, 2010). Dos principais compostos derivados dos ácidos benzoicos, destacam-se os ácidos salicílico, gálico, elágico, protocatéico e vanílico (Jakobek *et al.*, 2007; Garrido & Borges, 2013).

Os ácidos hidroxicinâmicos são biossintetizados a partir da fenilalanina. Os ácidos hidroxicinâmicos mais recorrentes são os ácidos *p*-cumárico, cafeico e ferúlico (Jakoberk *et al.*, 2007).

Os taninos hidrolisáveis e complexos são compostos fenólicos capazes de provocar a precipitação das proteínas e proporcionar propriedades adstringentes em diferentes alimentos (Soares *et al.*, 2012). Os taninos hidrolisáveis podem ser suscetíveis à degradação desencadeada pela hidrólise enzimática ou não enzimática, ou então pelas alterações do pH (Garrido & Borges, 2013). Estes compostos encontram-se ligados ao ácido gálico (Figura 8 B) e ao ácido elágico (Figura 8 A) dando origem, de forma respetiva, aos galotaninos e aos elagitaninos (Nunes, 2012).

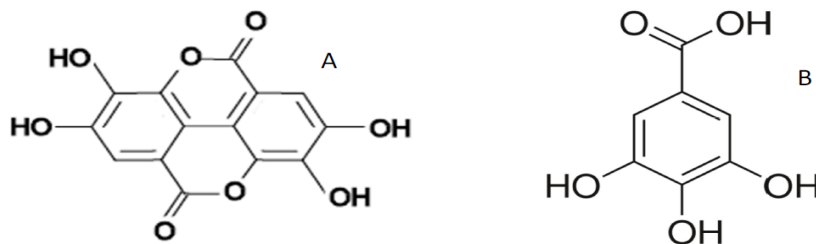


Figura 8: Estrutura do ácido elágico (A) e ácido gálico (B) (adaptado de Oliveira, 2014)

Os taninos complexos são constituídos, tanto por elementos estruturais do grupo dos taninos hidrolisáveis, como por elementos estruturais do grupo dos taninos condensados. Por exemplo, no caso das procianidina-elagitaninos, estas contêm unidades (+)-catequina ou (-)-epicatequina ligadas a glicosídeos e a uma unidade de elagitanino. Após uma reação de hidrólise, os taninos complexos dividem-se em (+)-catequina ou (-)-epicatequina e em ácido gálico ou ácido elágico (Garrido & Borges, 2013).

Os estilbenos possuem um esqueleto C6-C2-C6, contendo o 1,2-difeniletileno como grupo funcional. O membro mais abundante da família dos

estilbenos é o resveratrol, que pode aparecer sob a forma livre ou então ligado a açúcares (Jakoberk *et al.*, 2007; Oliveira, 2014).

As cumarinas contemplam compostos derivados de latonas dos ácidos o-hidroxicinâmicos, presentes de forma abundante na classe das plantas. Os compostos cumáricos mais conhecidos são as benzo-a-pironas, a umbeliferona, a herniarina e o esculetol (Jakoberk *et al.*, 2007; Ruivo, 2012).

1.5.1.2. Flavonóides

Os flavonóides constituem um dos maiores grupos de compostos fenólicos. Existem mais de 8000 estruturas fenólicas atualmente conhecidas, das quais 4000 foram identificados como flavonóides (Tsao, 2010). Estes compostos podem ser subdivididos em subclasses (Figura 9), tais como, flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanóis e antocianidina (Garrido & Borges, 2013; Jorjong *et al.*, 2015).

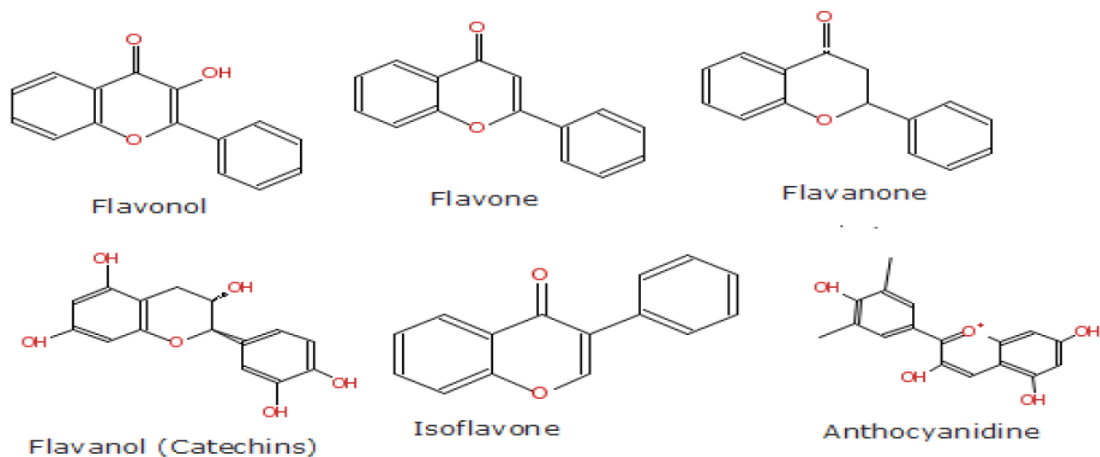


Figura 9: Estruturas químicas dos flavonoides (adaptado de Semedo, 2012).

Os flavonóis são amplamente distribuídos na natureza. As agliconas mais comuns, destes compostos, são o canferol, a miricetina e a quercetina, sendo a quercetina e o canferol os encontrados em maiores quantidades nos frutos (Tsao, 2010; Jorjong *et al.*, 2015).

As flavonas têm uma estrutura semelhante às flavanonas, no entanto estas apresentam insaturações entre as ligações de C-2 e C-3 no anel C. As agliconas mais comuns são a apigenina e a luteolina (Tsao, 2010). Por outro lado as agliconas, mais comuns das flavanonas são a hesperedina, hesperitina e naringenina (Oliveira, 2014).

As isoflavonas são isómeros estruturais das flavanonas. Estes isómeros existem em grandes quantidades, sendo muitas vezes confundidos, com hormonas e esteroides. As isoflavonas mais comuns aparecem sob a forma de agliconas, glicosídeos, acetil-glicosídeos e malonil-glicosídeos (Tsao, 2010; Garrido & Borges, 2013).

Os flavanóis possuem um anel C saturado com um grupo hidroxilo ou galoil. Os compostos mais comuns são a (+)-catequina e (-)-epicatequina (Tsao, 2010). Os taninos condensados (proantocianidinas) fazem parte do grupo dos flavanóis, podendo estes serem oligoméricos ou poliméricos solúveis ou insolúveis em água. O termo proantocianidinas surge devido ao mecanismo que estes taninos dispõem, em libertarem antocianinas quando aquecidos em meio fortemente ácido e alcoólico, através da rutura das ligações estabelecidas entre as unidades monoméricas. As proantocianidinas, também são muito conhecidas por serem responsáveis pela adstringência característica em alguns alimentos (Nunes, 2012).

As antocianinas são compostos hidrossolúveis responsáveis pela grande diversificação de cores atrativas dos pequenos frutos (Tsao, 2010). Estes compostos são muito instáveis e suscetíveis a degradação resultante de diversos fatores, tais como, o pH, a temperatura, a atividade enzimática e a interação entre outros componentes alimentares (ácido ascórbico, iões metálicos, açúcares, entre outros). Apesar das antocianinas estarem associadas às diferentes cores, estas também podem surgir sob a forma incolor, dependendo do pH (Kylli, 2010). Desta maneira, as antocianinas sob a forma de estrutura de oxónio (que vai do laranja ao roxo) predominam a pH 1, no entanto as antocianinas sob forma hemiacetal (incolor) predominam a pH 4,5 (León-González *et al.*, 2012). Nestes compostos quanto maior o número de grupos hidroxilos e glucósidos mais intensa é a cor azul, por outro lado quanto maior for o número de grupos metóxilos mais intensa é a cor vermelha (Garrido & Borges, 2013).

1.5.2. Atividade antioxidante e protetora dos compostos fenólicos

Os pequenos frutos são muito conhecidos pelas suas propriedades antioxidantes provenientes dos diferentes compostos bioativos (vitaminas, carotenóides, compostos fenólicos, entre outros). Diferentes estudos, em matrizes de pequenos frutos, têm vindo a demonstrar a existência de uma forte relação entre o tipo de composto bioativo e a sua atividade antioxidante, com o objetivo de promover os efeitos benéficos na saúde dos consumidores (Chia-Jung, 2013; Sánchez-Salcedo *et al.*, 2015; Charoenkiatkul *et al.*, 2016).

Os antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos/endógenos (sintetizados pelo organismo) ou então como não-enzimáticos/exógenos (provenientes da dieta alimentar) (Figura 10) (Oliveira, 2014).

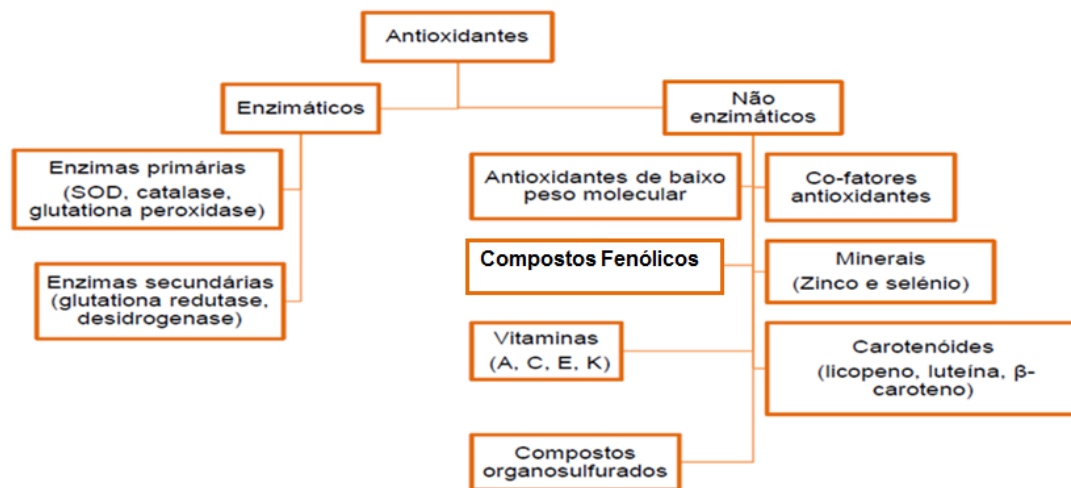


Figura 10: Classificação dos antioxidantes (adaptado de Oliveira, 2015).

Por definição, a atividade antioxidante é a capacidade que um composto tem em inibir e/ou diminuir a degradação oxidativa dos vários constituintes dos alimentos, particularmente dos lípidos.

Nos últimos anos tem-se observado um interesse crescente no estudo de substâncias antioxidantes devido, principalmente, ao conhecimento sobre o efeito dos radicais livres no organismo. Sendo a oxidação é uma parte fundamental da via aeróbia e do metabolismo parece evidente que os radicais livres sejam produzidos espontaneamente ou por alguma disfunção biológica.

Esses radicais livres, cujo elétron desemparelhado está centrado nos átomos de oxigênio ou azoto, são denominados espécies reativas de oxigênio (Reactive oxygen species, ROS), ou espécies reativas de azoto (Reactive nitrogen species (RNS)) ambas radicalares (com um ou mais elétrons desemparelhados) ou não. No organismo, os radicais livres quando em quantidades baixas (fisiológicas) encontram-se envolvidos na fagocitose, na regulação do crescimento celular, na sinalização intercelular e na síntese de substâncias biológicas. No entanto, quando em excesso acarretam efeitos prejudiciais por conduzir à morte celular. Assim, as células possuem mecanismos de defesa e sistemas antioxidantes para eliminação de ROS e RNS quando estes são insuficientes ocorre o stresse oxidativo. O stresse oxidativo é pois, o resultado do desequilíbrio entre moléculas antioxidantes e oxidantes, causado por perturbações na produção, distribuição ou por excesso de ROS ou RNS a partir de fontes endógenas ou fatores ambientais da qual resultam efeitos nocivos sobre as células (Jeong *et al.*, 2014). Devido a isso, o stresse oxidativo tem sido relacionado com a patogênese de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, alguns tipos de cancro, bem como no processo de envelhecimento. De ressaltar que as espécies reativas em geral podem ser ao mesmo tempo causa e consequência de patologias humanas associadas ao stresse oxidativo (Sánchez-Picó *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015).

Os flavonóides desempenham um papel relevante na redução do risco da aterosclerose e no fortalecimento do sistema imunológico (propriedades anti-inflamatórias e anti-alérgicas) (Nunes, 2102; Koirola *et al.*, 2016).

As antocianinas para além de possuírem efeitos anti-inflamatórios e antissépticos, estas também têm a capacidade de neutralizam os radicais livres responsáveis por doenças cardiovasculares, levando desta forma, à redução do risco do acidente vascular cerebral (AVC) (Jeong *et al.*, 2014).

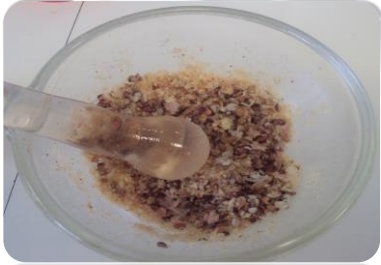
1.5.3. Bioacessibilidade dos compostos fenólicos

A bioacessibilidade dos compostos fenólicos é definida como sendo a quantidade que fica disponível para absorção no intestino delgado após um processo de digestão. Por outro lado, o termo biodisponibilidade é utilizado

numa visão mais alargada, pois contempla a quantidade disponível no local de ação e aquela que é assimilada pelas células.

A biodisponibilidade dos nutrientes é normalmente determinada pela medição da sua concentração plasmática (ensaio “*in vivo*”). Tanto a bioacessibilidade como a biodisponibilidade dependem das características dos compostos, da matriz alimentar, do pH, da temperatura, da presença de inibidores ou potenciadores de absorção, da presença de enzimas, entre outros fatores relacionados com a variabilidade individual (a acidez do estômago, atividade enzimática e estado fisiológico) (Bouayed *et al.*, 2011; Pereira, 2014; Stanisavljević *et al.*, 2015). O pH do meio é um fator importante que interfere diretamente na bioacessibilidade dos compostos fenólicos. Neste sentido, as antocianinas são compostos estáveis a valores de pH baixos (entre 1 a 3) o que explica a redução da bioacessibilidade, destes compostos perante as condições alcalinas do intestino delgado (Stanisavljević *et al.*, 2015)

O conhecimento da bioacessibilidade dos compostos fenólicos constitui um fator chave para afirmar que os antioxidantes presentes nos alimentos conferem uma maior proteção contra o “*stress oxidativo*”. Efetivamente, para que estes compostos possam apresentar efeitos “*in vivo*”, estes têm que chegar aos tecidos na sua forma nativa ou então sob a forma metabolizada e em quantidades suficientes para poderem exercer o seu efeito (Stanisavljević *et al.*, 2015).



CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Amostras

As camarinhas deste estudo foram colhidas de forma aleatória de arbustos dunares, situados em diferentes pontos da área da praia de Mira (distrito de Coimbra, Portugal; Latitude – 40° 27` N; Longitude – 08° 45` W), durante o mês de setembro do ano de 2014.

Após a colheita, cerca de 250 g, estas foram transportadas para um laboratório das instalações da Escola Superior Agrária de Viseu (ESAV-IPV), onde foram limpas. Dessa amostragem (Figura 11) foram selecionadas, aleatoriamente, amostras para a realização das análises físicas, químicas e fenólicas.

Para a realização das análises fenólicas, estas foram separadas em dois estados de maturação (camarinhas brancas e camarinhas translúcidas), acondicionadas em pequenos sacos de congelação e armazenadas inteiras a uma temperatura de -22 °C até à execução das diferentes análises.

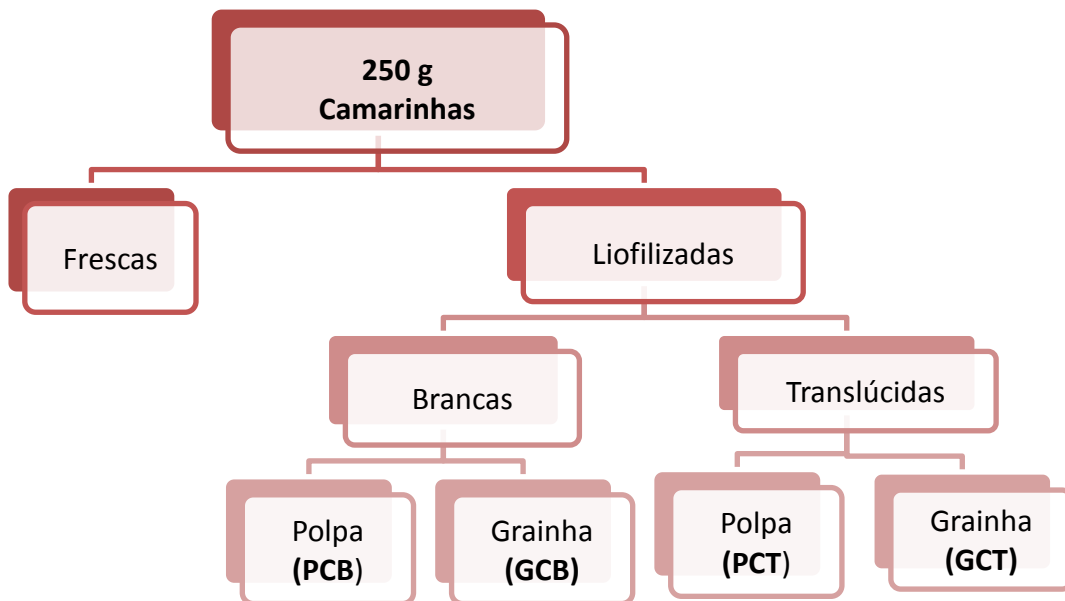


Figura 11: Esquema referente à divisão da amostragem colhida.

2.2. Caracterização física das camarinhas

2.2.1. Peso e dimensões

A caracterização física das camarinhas, quanto ao peso e às suas dimensões (caracterização biométricas) foi realizada a partir de uma amostragem aleatória de 50 camarinhas.

O processo de medição individual da altura (H) e do diâmetro (D) foi realizado como auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo Absolute Digimatic). Relativamente à massa essa foi obtida através de uma balança analítica. Com os valores da altura e do diâmetro foi possível calcular outras propriedades, segundo as equações:

$$\text{Calibre} = \frac{(\text{altura} + \text{diâmetro})}{2} \quad (\text{Pimpão } et al., 2013)$$

$$\text{Volume} = \pi \times \frac{4}{3} (\text{calibre})^3 \quad (\text{León-González } et al., 2013)$$

$$\text{Massa específica (densidade)} = \frac{\text{massa}}{\text{volume}} \quad (\text{Calviño-Cancela, 2002})$$

2.2.2. Cor

A medição da cor *standard* dos alimentos pode ser realizada recorrendo uma diversificada gama de espaços de cor. No entanto, o Hunter Lab é o sistema mais utilizado para determinar a cor nos alimentos através das variáveis L*a*b* (CIELab) (Guiné *et al.*, 2010). No espaço de cor Hunter (Figura 12), o valor de L* representa a luminosidade da cor, ou seja, distingue as cores claras das escuras. Este parâmetro varia do valor zero (preto) a +100 (branco). O parâmetro a* varia de verde (-a) a vermelho (+a) e por fim o parâmetro b* varia da cor azul (-b) a amarelo (+b).

A determinação da cor das camarinhas foi realizada no sistema CIE Lab a partir de uma amostragem de 20 camarinhas e com o auxílio de um colorímetro.

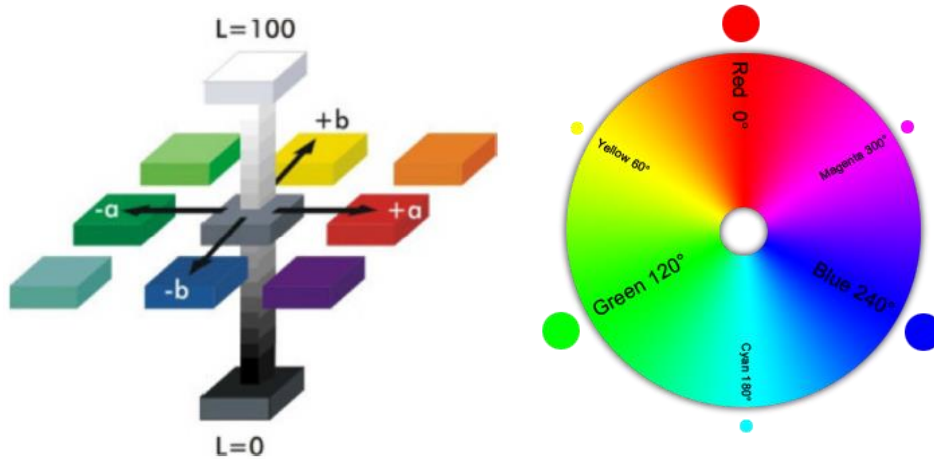


Figura 12: Espaço de cor Hunter Lab (esquerda) e parâmetros de tonalidade (h°) (direita).

O colorímetro (Chroma Meter - CR-400, Konica Minolta) foi inicialmente calibrado, em primeiro contra um padrão de referência branco ($X = 84,60$, $Y = 89,46$ e $Z = 93,85$) e depois contra um padrão de referência preto ($X = 4,12$, $Y = 4,38$ e $Z = 4,71$), no qual a visualização dos três parâmetros (X , Y e Z) corresponde à representação das três cores primárias (X - vermelho, Y - verde e Z - azul).

A variável tonalidade (h°) distingue as cores verde, azul, amarelo e vermelho. Esta percepção da cor resulta das diferenças da absorção da energia radiante dos vários comprimentos de onda. Por fim, o “chroma” (C), também designado por saturação ou pureza, indica o quanto a cor difere do cinzento, ou seja, é o parâmetro que distingue as cores vivas das cores baças (Barros, 2012).

No que diz respeito aos parâmetros tonalidade (h°) e chroma (C), estes foram calculados segundo as equações:

$$h^\circ = \tan^{-1}\left(\frac{a}{b}\right)$$

$$h^\circ = 180 + \tan^{-1}\left(\frac{a}{b}\right)$$

$$C = \sqrt{a^2 + b^2}$$

2.2.3. Textura

A análise instrumental do perfil da textura é um dos métodos que permitem determinar a textura dos alimentos por simulação ou por imitação da mastigabilidade, ou seja, esta análise tem como objetivo comprimir a amostra duas vezes simulando a ação da mandíbula.

Neste estudo, num texturómetro (TA XT Plus - Texture Analyser) foram analisados os perfis de textura de 40 camarinhas. No qual numa primeira fase foi realizada uma pequena compressão seguida de um relaxamento e por fim, uma última compressão. A resistência oferecida pela amostra à compressão, durante o teste, traduz-se graficamente na força versus tempo, no qual é possível calcular os parâmetros da textura e caracterizar a amostra (Barros, 2012).

O procedimento foi realizado nas seguintes condições: pré-teste com velocidade de 1,50 milímetros/segundo (mm/s); teste com velocidade de 1,00 mm/s; pós-teste de 10,00 mm/s; distância de 6 mm, usando uma célula de carga de 50 Kg.

Os resultados foram tratados com o Software Expoente TEE (Stable Micro Systems). Com os resultados obtidos foi possível determinar a firmeza (força no pico mais alto) e elasticidade (distância no ponto mais alto), como ilustrado na Figura 13.

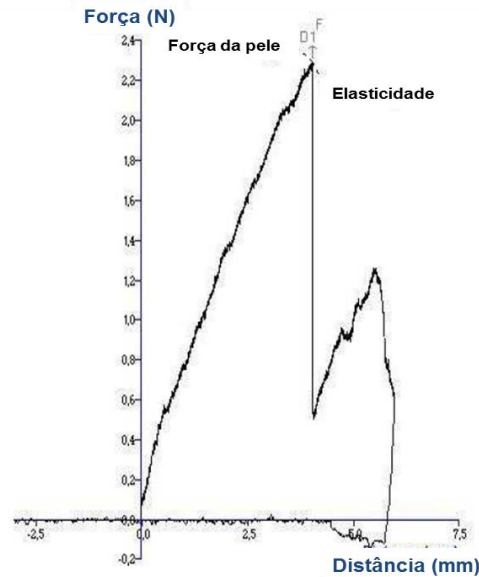


Figura 13: Exemplo de uma curva típica da força-distância no teste de perfuração da camarinha.

2.3. Caracterização química das camarinhas

2.3.1. Determinação da humidade

A determinação da humidade das camarinhas foi realizada numa balança de halogéneo (Mettler Toledo, HG53 Halogen), nas seguintes condições: temperatura de 120 °C e uma velocidade de secagem 3 (numa escala de 1 a 5).

Para realizar uma correta medição da humidade, inicialmente, a balança foi tarada sem amostra e só depois foram introduzidas cerca de 5 g de amostra no prato de medição.

Este tipo de método teve como objetivo medir a perda de peso, em percentagem (%), após desidratação das camarinhas, até que estas obtivessem um peso constante. Esta determinação foi realizada em triplicado.

2.3.2. Determinação da fibra total (bruta)

Segundo a Comissão do Codex Alimentarius em 2006, o termo “fibra dietética representa os polímeros de glúcidos com um grau de polimerização não inferior três, dos quais não são digeridos nem são absorvidos no intestino delgado”.

O método de Weende é um método clássico que consiste, na determinação da fibra bruta através da realização de uma digestão ácida seguida uma digestão básica. A digestão ácida remove os amidos, açúcares e parte da pectina e da hemicelulose dos alimentos, por outro lado a digestão básica retira as proteínas, pectinas e hemiceluloses. Desta forma a fibra bruta consiste, principalmente, em celulose contendo pequenas quantidades de lenhina e hemicelulose (Santos, 2013).

Para determinar a percentagem de fibra bruta foi realizado um processo em triplicado recorrendo a amostra liofilizada (1 g) (W_0). Para realizar uma digestão ácida foi introduzida, no equipamento (Dosi-Fiber Selecta), uma solução de água destilada com ácido sulfúrico (95-97%), a 1,25% (v/v). Para realizar uma digestão alcalina (básica) foi adicionada uma solução de água destilada com hidróxido de sódio a 1,25% (m/v). Entre as duas digestões foram realizadas lavagens com água destilada. Após o processo estar concluído, os cadinhos foram levados à estufa, a 104 °C durante 8 horas (W_1), e por fim à mufla, a 550 °C durante 3 horas (W_2).

A % de fibra total foi determinada de acordo com as respetivas expressões:

$$\% \text{ Fibra bruta} = \frac{(W_1 - W_2)}{W_0} \times 100$$

$$\% \text{ Fibra bruta (mat. seca)} = \frac{(W_1 - W_2)}{W_0} \times 100 \times \left[\frac{100}{(100 - H)} \right]$$

Sendo:

H - % de humidade da amostra;

W_0 – massa da amostra;

W_1 - massa do cadinho após estufa;

W_2 – massa do cadinho + amostra após mufla.

2.3.3. Determinação da acidez titulável

A determinação da acidez foi efetuada segundo a Norma Portuguesa NP-1421 (1977), a qual é destinada a frutos, produtos hortícolas e seus derivados. Esta determinação avalia o volume de solução alcalina normal, expresso em centímetros cúbicos (mililitros), necessário para neutralizar 100 cm³ do produto, em solução líquida.

Para a determinação da acidez titulável (TAc) foram pesadas 25 g (m_0) de camarinhas frescas para um erlenmeyer, no qual foram adicionados 50 mL de água destilada previamente, fervida, arrefecida (à temperatura ambiente) e neutralizada a pH 7,0. Posteriormente ajustou-se um sistema de condensação por refluxo e aqueceu-se o preparado em banho-maria durante 30 minutos. Deixou-se arrefecer, à temperatura ambiente, transferiu-se o conteúdo para um balão de diluição de 250 mL (V_0) e fez-se o volume com água neutralizada. Seguidamente o preparado foi submetido a uma filtração a vácuo com um filtro tipo G2. O Filtrado foi transferido para um balão de diluição de 250 mL.

Por fim pipetaram-se 25 mL do filtrado (V_1), para um erlenmeyer, adicionaram-se três gotas do indicador de fenolftaleína, a 2% e procedeu-se à titulação, com hidróxido de sódio a 0,025 N, até ocorrer uma viragem da cor para um rosa persistente durante aproximadamente 30 segundos (V_2). O processo foi realizado em duplicado, tendo sido realizadas titulações em triplicado.

A acidez titulável foi expressa em g ácido tartárico/100 g de amostra e determinada de acordo com a seguinte expressão:

$$TAc = \frac{V_2 \times 0,025 \times V_0 \times f.c}{V_1 \times m_0} \times 1000$$

Sendo:

V_0 - Volume do balão de diluição (mL);

V_1 - Volume da toma de solução de amostra para titulação (mL);

V_2 - Volume de titulante (NaOH) gasto na titulação (mL);

m_0 – massa da toma da amostra (g);

f.c – fator de conversão para ácido tartárico (0,075).

2.3.4. Determinação do teor de sólidos solúveis

A medição do teor de sólidos solúveis (TSS) é realizada para determinar uma aproximação da quantidade de açúcar (sacarose) nos diferentes frutos. Para este efeito foi usada uma escala denominada, como escala numérica Brix. O resíduo seco solúvel (°Brix) foi determinado de acordo com a Norma Portuguesa NP- 785 de 1985.

Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur colocou-se 1 gota do sumo, das polpas de camarinhas, sobre a superfície do prisma do refratómetro portátil (Atago 3T). Para a realização desta análise procedeu-se à leitura do índice de refração em triplicado a uma temperatura de 21 °C.

2.3.5. Determinação do teor de açúcares totais e redutores

Para determinar o teor de açúcares totais e redutores existem vários métodos químicos, não seletivos que fornecem resultados com elevado grau de confiabilidade (Figueiredo, 2012).

A determinação do teor de açúcares totais e redutores nas camarinhas foi executada segundo a técnica modificada de Luff-Schoorl descrita na norma portuguesa NP-1420 de 1987.

Para a determinação dos açúcares totais e redutores foram pesadas 8 g (m) de amostra fresca. Posteriormente as camarinhas foram trituradas e transferidas para um balão de diluição de 250 mL onde foram adicionados 50 mL de água destilada. Após este procedimento realizou-se a etapa de defecção, onde foram adicionados ao preparado do balão 12,5 mL de solução carrez I e 12,5 mL de solução carrez II, agitou-se e fez-se o volume do balão com água destilada. Após a formação de um precipitado branco foi realizada uma filtração a vácuo.

No caso da determinação dos açúcares totais foi realizado um processo de inversão, no qual num erlenmeyer foram adicionados 50 mL da solução defecada e 3,5 mL de solução de ácido clorídrico, a 1,19 g/cm³. Posteriormente homogeneizou-se o preparado e colocou-se em banho-maria a 69 °C, durante 5 minutos. Após este processo foi realizado um rápido arrefecimento e uma posterior adição de 5 gotas de fenolftaleína, a 2%. Com uma pipeta, gota a gota, foi adicionada uma solução de o hidróxido de sódio (40% m/v) até aparecer uma coloração de rosa persistente. Por fim, com uma outra pipeta, foram adicionadas gotas de ácido clorídrico (1+9) até que a coloração rosa desaparecer-se por completo.

Num balão, de fundo redondo, foram adicionados dez reguladores de ebulição, 10 mL do filtrado (solução defecada (V')); ou solução da inversão (V''), 25 mL da solução de Luff-Schoorl e por fim 15 mL de água destilada.

Posteriormente foi ajustado um sistema de condensação por refluxo, onde o preparado anterior foi levado à ebulição durante 30 minutos. Após os 30 minutos procedeu-se a um arrefecimento rápido, sem agitação e em banho de água fria. Logo após o arrefecimento foram adicionados 9 mL de solução de iodeto de potássio (1 mol/dm³) e 20 mL de solução de ácido sulfúrico (1+6), agitando-se até cessar a efervescência.

Por fim realizou-se uma titulação com tiosulfato de sódio (0,1 N) até aparecer a coloração amarelo mostarda, após isso foram adicionados 2 mL do indicador de amido, a 2%, adquirindo, desta forma, uma coloração azulada, seguiu-se com a titulação até o preparado ficar com uma tonalidade esbranquiçada. Registou-se o volume gasto. A determinação dos açúcares redutores e totais foi realizada em duplicado, tendo sido realizadas três titulações em cada ensaio.

Os ensaios em branco foram realizados seguindo o mesmo processo, no entanto com a adição de água destilada em vez da amostra.

O teor em açúcares redutores e totais foi expresso em % de matéria seca e determinado de acordo com as respectivas expressões:

$$\% \text{ Açúcares redutores} = \frac{20 \times mr}{(V' \times m) \times (100 - H)} \times 100$$

$$\% \text{ Açúcares totais} = \frac{40 \times mt}{(V'' \times m) \times (100 - H)} \times 100$$

Sendo:

V' - Volume do filtrado obtido após defecação (mL);

V'' - Volume do filtrado obtido após defecação e inversão (mL);

mr e mt - massa de açúcar invertido (corresponde na tabela A NP – 1420 1987 à diferença de volumes de tiosulfato de sódio 0,1 N gastos no ensaio em branco);

m – massa da toma da amostra (g);

H – % da humidade da amostra fresca.

2.3.6. Determinação do teor de vitamina C

O ácido ascórbico (vitamina C) está presente naturalmente em muitos frutos e vegetais. Além de estabelecer uma fixação dos radicais livres e de

controlar o escurecimento enzimático, esta vitamina é um dos aditivos mais utilizados na indústria alimentar (Gutiérrez *et al.*, 2007).

Para a determinação do teor de vitamina C foram realizados ensaios em triplicado com camarinhas frescas (5 g). Nesta determinação as camarinhas foram trituradas e submetidas a uma filtração a vácuo de modo a obter um filtrado. Posteriormente num erlenmeyer foram adicionados 5 mL do filtrado, 10 mL de solução de ácido oxálico (1% m/v) e 1 mL de solução de ácido clorídrico (1,0 N) e procedeu-se à titulação com a solução 2,6-dicloroindofenol (DIP). O ponto final da titulação é detetado na viragem da solução incolor para rosa.

Para efetuar os cálculos da análise da vitamina C foi realizada uma curva de calibração com ácido ascórbico (Figura 14).

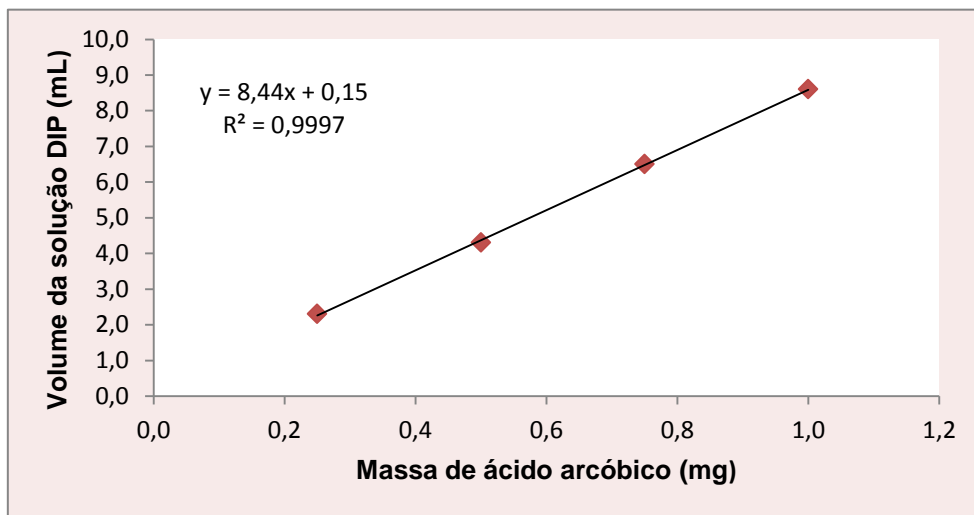


Figura 14: Curva de calibração da vitamina C.

2.4. Preparação dos extratos

Os extratos resultantes, dos diferentes métodos de extração foram usados para a determinação das análises da componente fenólica (compostos fenólicos totais; orto-difenóis, flavonóides, taninos; atividade antioxidante e avaliação da bioacessibilidade).

2.4.1. Métodos de extração dos componentes fenólicos das camarinhas

As amostras de camarinhas brancas e de camarinhas rosadas a translúcidas foram submetidas a um processo de liofilização (Freeze Dryer; -48

°C e a 5 mTorr de vácuo), de forma a preservar as suas propriedades nutricionais. Depois deste procedimento as camarinhas foram trituradas e separada em diferentes tipos de amostras:

- Polpa Camarinha Branca (PCB);
- Polpa Camarinha Translúcida (PCT);
- Grainhas Camarinha Branca (GCB);
- Grainhas Camarinha Translúcida (GCT).

Após o processo de separação, as amostras foram transferidas para porta amostras de plástico hermeticamente fechados e devidamente identificados, sendo estes posteriormente armazenados em lugar seco.

Para o processo de extração os solventes utilizados foram:

- Solução etanol:água 50 % (EtAg);
- Solução acetona:água 50 % (AcAg);
- Metanol a 100% (Me).

Para a obtenção dos diferentes extratos foram realizadas duas extrações sequenciais, em que a segunda foi realizada usando as mesmas condições da primeira.

Num erlnmeyer foram adicionados 2,5 g de amostra com 25 mL do respetivo solvente. Em seguida, o preparado foi colocado em banho de ultra-sons a 40 °C durante 60 minutos. Após o tempo de extração foi realizada uma filtração a vácuo. Os primeiros extratos foram transferidos para porta amostras identificados e por fim armazenados à temperatura de -22 °C, até à realização das diferentes análises. Ao resíduo foram adicionados, novamente 25 mL do solvente e repetiu-se o processo de extração, permitindo obter o segundo extrato de cada solvente.

Parte Experimental

No que diz respeito às extrações obtidas para cada amostra a codificação foi realizado segundo a tabela 1.

Tabela 1: Descrição e codificação atribuída a cada extração realizada nas camarinhas.

Codificação das Amostras	Descrição	Solvente	Extrato
PCB_EtAg1	Polpa Camarinhas Brancas	Etanol + Água	1º
PCB_EtAg2	Polpa Camarinhas Brancas		2º
PCT_EtAg1	Polpa Camarinhas Translúcidas		1º
PCT_EtAg2	Polpa Camarinhas Translúcidas		2º
GCB_EtAg1	Grainhas Camarinhas Brancas		1º
GCB_EtAg2	Grainhas Camarinhas Brancas		2º
GCT_EtAg1	Grainhas Camarinhas Translúcidas		1º
GCT_EtAg2	Grainhas Camarinhas Translúcidas		2º
PCB_AcAg1	Polpa Camarinhas Brancas	Acetona+ Água	1º
PCB_AcAg2	Polpa Camarinhas Brancas		2º
PCT_AcAg1	Polpa Camarinhas Translúcidas		1º
PCT_AcAg2	Polpa Camarinhas Translúcidas		2º
GCB_AcAg1	Grainhas Camarinhas Brancas		1º
GCB_AcAg2	Grainhas Camarinhas Brancas		2º
GCT_AcAg1	Grainhas Camarinhas Translúcidas		1º
GCT_AcAg2	Grainhas Camarinhas Translúcidas		2º
PCB_Me1	Polpa Camarinhas Brancas	Metanol	1º
PCB_Me2	Polpa Camarinhas Brancas		2º
PCT_Me1	Polpa Camarinhas Translúcidas		1º
PCT_Me2	Polpa Camarinhas Translúcidas		2º
GCB_Me1	Grainhas Camarinhas Brancas		1º
GCB_Me2	Grainhas Camarinhas Brancas		2º
GCT_Me1	Grainhas Camarinhas Translúcidas		1º
GCT_Me2	Grainhas Camarinhas Translúcidas		2º

2.4.2. Determinação do teor de compostos fenólicos totais

Para a determinação dos compostos fenólicos totais utilizou-se o método de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2009). A mistura dos ácidos fosfowolfrâmico e fosfomolibdico, em meio básico reduz-se e oxida os compostos fenólicos, dando origem a óxidos azuis de wolfrâmio ($W_8 O_{23}$) e molibdeno ($Mo_8 O_{23}$) (León-González *et al.*, 2012).

Num tubo foram adicionados 125 μ L de extrato (diluído 1:3), 750 μ L de água destilada e 125 μ L de reagente de folin. Após a adição de todos os componentes esperou-se 6 minutos, juntou-se 2 mL da solução de carbonato de sódio, a 5%, agitou-se e colocou-se no escuro durante 60 minutos à temperatura ambiente. O processo de determinação dos compostos fenólicos totais foi realizado em duplicado para todos os extratos em estudo. A leitura da absorvância realizou-se num comprimento de onda de 760 nm (Espectrofotómetro – UV Mini – 1240 – Shimadzu, Japão).

Em paralelo foram realizados ensaios em branco, dentro das mesmas condições, substituindo os 125 μ L de extrato por 125 μ L de água destilada.

Para a quantificação do teor em compostos fenólicos foi realizada uma curva de calibração (Figura 15), com uma solução de ácido gálico (0-1 g/L).

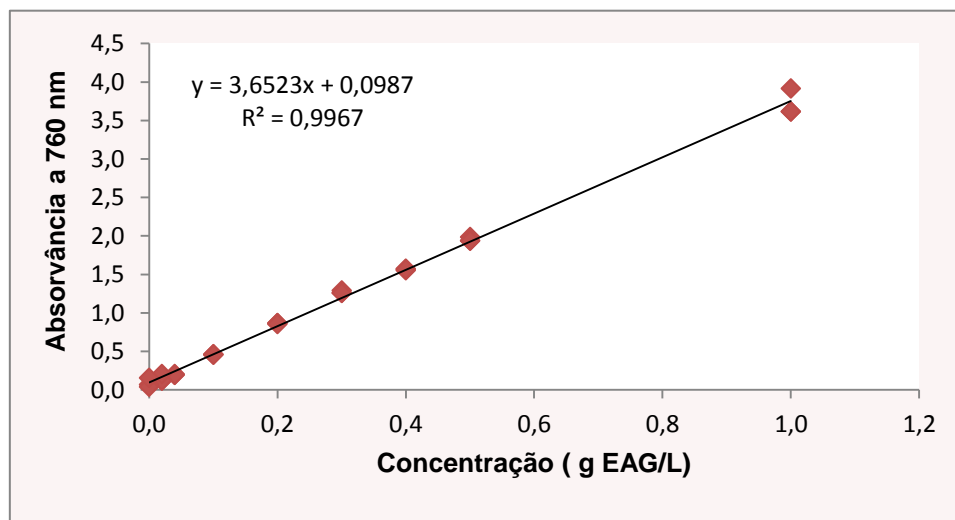


Figura 15: Curva de calibração dos compostos fenólicos.

Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de amostra (mg EAG/100 g), de acordo com a

seguinte equação: $y = 3,6523x + 0,00987$, tendo em conta a massa da amostra e o volume do extrato.

2.4.3. Determinação do teor de orto-difenóis

O método adotado para a determinação do teor de orto-difenóis foi de acordo com a reação com molibdato descrito por Mateos *et al* (2001). Este método leva à junção dos orto-difenóis com os iões de molibdato. Desta junção, resulta uma alteração na cor originando uma coloração alaranjada que tem absorção máxima a um comprimento de onda de 370 nm.

Num tubo foram adicionados 500 µL de extrato (diluído 1:3) com 1 mL de solução de molibdato de sódio, a 5% (dissolvido em solução de metano: água destilada (50:50 v/v)). Após a adição de todos os componentes, agitou-se e deixando-se repousar 10 a 15 minutos à temperatura ambiente. O processo de determinação do teor em orto-difenóis foi realizado em duplicado para todos os extratos em estudo. A leitura da absorvância realizou-se num comprimento de onda de 370 nm (Espectrofotómetro – UV Mini – 1240 – Shimadzu, Japão).

Em paralelo foram realizados brancos, dentro das mesmas condições, substituindo os 500 µL de extrato, por 125 µL de água destilada.

Para a quantificação do teor em orto-difenóis foi realizada uma curva de calibração (Figura 16), com uma solução de ácido gálico (0,02- 0,5 g/L).

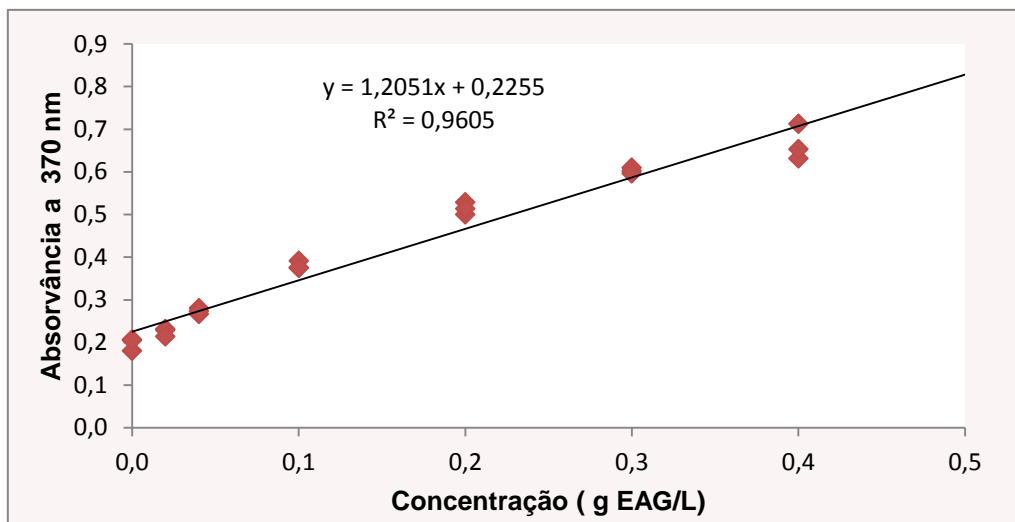


Figura 16: Curva de calibração do orto-difenóis.

Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de amostra (mg EAG/100 g) de acordo com a seguinte equação: $y = 1,2051x + 0,2255$, tendo em conta a massa da amostra e o volume do extrato.

2.4.4. Determinação do teor de flavonóides

Na determinação do teor de flavonóides o método utilizado foi uma adaptação do descrito por Meda *et al.* (2005). Neste processo, para um tubo, foram adicionados 500 μ L de extrato (diluído 1:3; 1:10) com 1,5 mL da solução metanólica de cloreto de alumínio, a 2%, agitou-se e colocou-se no escuro durante 10 minutos à temperatura ambiente. O processo de determinação do teor de flavonóides foi realizado em duplicado para todos os extratos em estudo. A leitura da absorvância realizou-se num comprimento de onda de 330 nm

Para a quantificação do teor em flavonóides foi realizada uma curva de calibração (Figura 17), com uma solução padrão de quercitina em diferentes concentrações (0,02-0,3 g EQ/L).

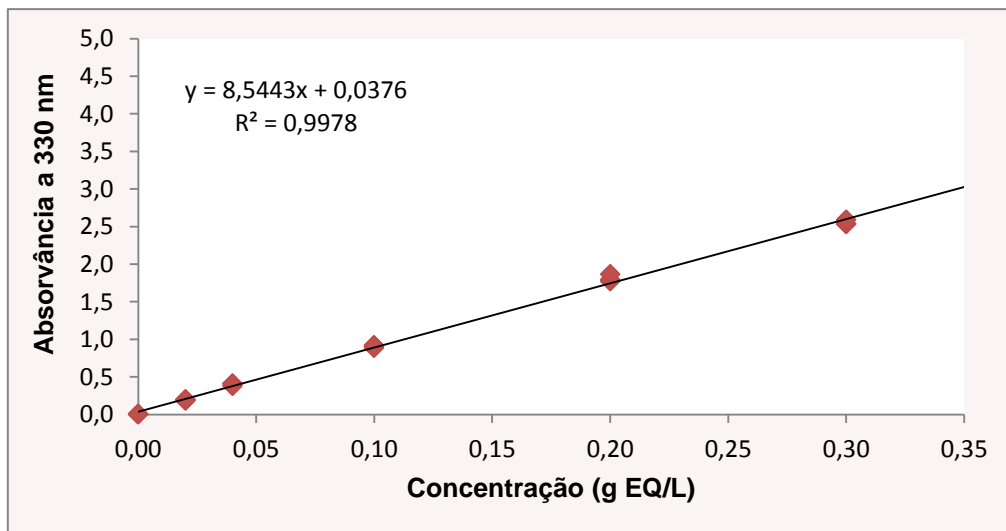


Figura 17: Curva de calibração dos flavonóides.

Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de quercitina por 100 gramas de amostra (mg EQ/100 g) de acordo com a seguinte equação: $y = 8,5443x + 0,0376$, tendo em conta a massa da amostra e o volume do extrato.

2.4.5. Determinação do teor de taninos totais

O método adotado para a determinação do teor em taninos totais foi adaptado de Oliveira, 2004. O princípio deste método baseia-se na capacidade das proantocianidinas originarem antocianidinas por aquecimento em meio ácido.

Num tubo de ensaio de vidro foram adicionados 200 µL de extrato (diluição de 1:10), 1,8 mL de água destilada, 6 mL de solução standard (200 mL de ácido clorídrico + 200 mL de butanol + 150 mg de sulfato de ferro) e agitou-se o preparado de forma suave. Posteriormente foram transferidos 2 mL, do tubo da solução inicial, para um novo tubo. Desses dois tubos, um foi colocado em banho-maria à temperatura de 100 °C durante 30 minutos (T₁) e o outro no escuro à temperatura ambiente (T₂). A determinação do teor em taninos totais foi realizada em duplicado para todos os extratos em estudo. A leitura da absorvância realizou-se num comprimento de onda de 540 nm (Espectrofotômetro – UV Mini – 1240 – Shimadzu, Japão).

Os resultados foram expressos em miligramas por 100 gramas de amostra (mg/100 g). O teor em taninos totais de cada amostra em avaliação foi determinado segundo a seguinte equação:

$$\text{Taninos totais (g/L)} = \text{Abs (T}_1 - \text{T}_2) \times 0,1736 \times \text{f.d} \times \text{v/m}$$

Sendo:

T₁ - Tubo do Banho- maria;

T₂ - Tubo do escuro;

f.d - fator de diluição

v- volume do extrato.

m- massa da amostra

2.4.6. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH

A determinação da atividade antioxidante, pelo método DPPH foi baseada segundo o método da captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) por oxidantes, produzindo um decréscimo da absorvância a 515 nm, devido à transferência de elétrons (Rufino *et al.*, 2007). Por ação de um

antioxidante ou por uma espécie radicalar, o DPPH (cor púrpura) é reduzido formando difenil-picril-hidrazina (cor amarela), tendo como consequência o desaparecimento da sua absorção. A partir dos resultados obtidos é possível determinar a percentagem de inibição.

Para realizar as análises da atividade antioxidante, dos diferentes extratos, inicialmente foi acertada a absorvância da solução de DPPH para um valor aproximado de 0,700 nm. Num tubo foram adicionados 100 µL de extrato (diluído 1:3) com 2 mL da solução de DPPH. De seguida colocou-se no escuro à temperatura ambiente durante 30 minutos. A determinação da atividade antioxidante, por DPPH foi realizada em duplicado para todos os extratos em estudo. A leitura da absorvância realizou-se num comprimento de onda de 515 nm (Espectrofotómetro – UV Mini – 1240 – Shimadzu, Japão).

Em paralelo foram realizados brancos, dentro das mesmas condições, substituindo os 100 µL de extrato, por 100 µL de água destilada.

A capacidade de eliminar o radical DPPH (% de Inibição) foi calculada utilizando-se a equação: $\% \text{ de Inibição} = \frac{A_C - A_A}{A_A} * 100$

Sendo:

A_C = absorvância da solução de DPPH sem a amostra;

A_A = absorvância da amostra com o DPPH.

Para a quantificação da atividade antioxidante foi realizada uma curva de calibração (Figura 18), com solução de trolox (0,8 g/L).

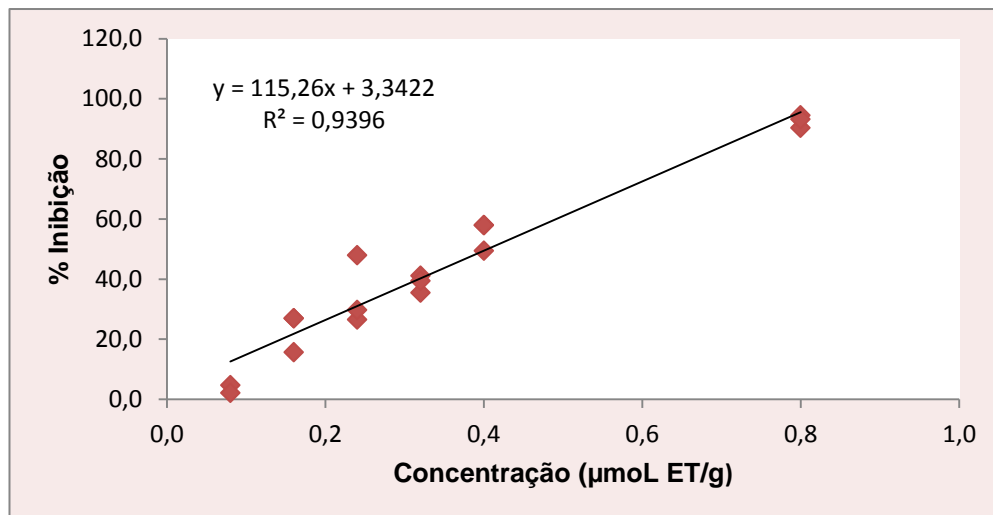


Figura 18: Curva de calibração da atividade antioxidante pelo método DPPH.

Os resultados foram expressos em atividade antioxidante (AA) em micromoles de equivalentes de trolox por grama de amostra ($\mu\text{mol ET/g}$) recorrendo à seguinte equação: $y = 115,26x + 3,4422$, tendo em conta a massa da amostra e o volume do extrato.

2.4.7. Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS

O método ABTS é um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante sendo realizado, através da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico). O radical ABTS^+ necessita de ser gerado por reações enzimáticas ou químicas (com o persulfato de potássio). O ABTS é solúvel tanto em água como em solventes orgânicos, permitindo a análise tanto a amostras hidrofílicas como lipofílicas (Tiveron, 2008).

No procedimento experimental foi preparada uma solução de ABTS (7 mm, numa solução de persulfato de potássio), que depois foi mantida no escuro durante 12 a 16 horas. Após este procedimento diluiu-se 1 mL da solução de ABTS preparada em 80 mL de solução tampão a pH 4,5 (1,14 mL de ácido acético + 1 L de água destilada).

Num tubo foram adicionados 100 μL de extrato (diluído 1:10; 1:20) com 2 mL da solução de ABTS. De seguida, colocou-se no escuro à temperatura ambiente durante 15 minutos. A determinação da atividade antioxidante segundo este método foi realizada em duplicado para todos os extratos em estudo. A leitura da absorvância realizou-se num comprimento de onda de 744 nm (Espectrofotómetro – UV Mini – 1240 – Shimadzu, Japão).

Em paralelo foram realizados brancos, dentro das mesmas condições, substituindo os 100 μL de extrato, por 100 μL de água destilada.

A capacidade de eliminar o radical ABTS (% de Inibição) foi calculada recorrendo à mesma equação da percentagem de inibição utilizada no método DPPH.

Para a quantificação da atividade antioxidante foi realizada uma curva de calibração (Figura 19), com solução de trolox.

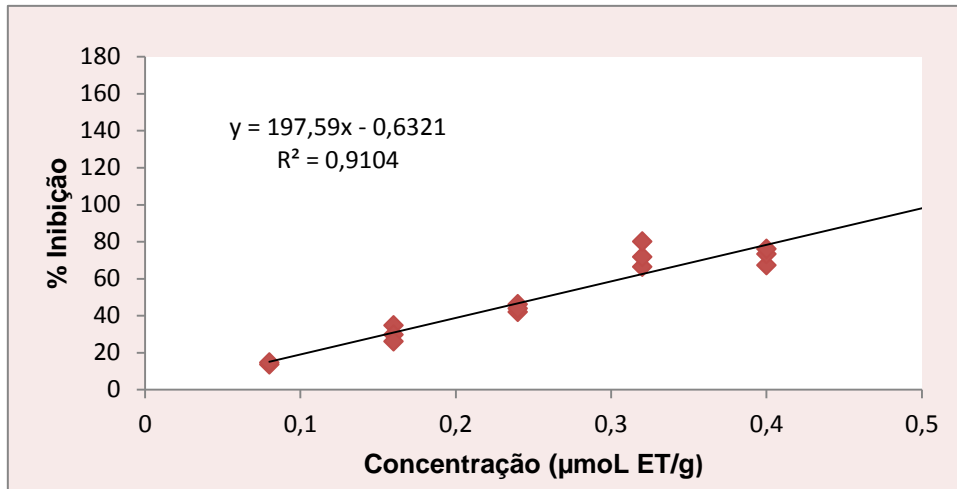


Figura 19: Curva de calibração da atividade antioxidante pelo método ABTS.

Os resultados foram expressos em atividade antioxidante (AA) em micromoles de equivalentes de trolox por grama de amostra ($\mu\text{mol ET/g}$) recorrendo à seguinte equação: $y = 197,59x - 0,6321$, tendo em conta a massa da amostra e o volume do extrato.

2.5. Simulação “*in vitro*” das condições do trato gastrointestinal

O método “*in vitro*”, deste estudo foi desenvolvido para realizar uma avaliação da bioacessibilidade dos compostos fenólicos e a sua atividade antioxidante nos primeiros extratos. A simulação “*in vitro*”, das diferentes etapas do trato gastrointestinal foi baseada no modelo proposto por McDougal, *et al.* (2005).

Para a realização desta simulação foi necessário a preparação de algumas soluções, tais com, solução de cloreto de sódio a 1% (m/v); solução salina de α -amilase a 1% (m/v) e a pH 6,5; solução salina de pepsina 1% (m/v) e a pH 2,0; solução salina de pancreatina a 0,3% (m/v) e a pH 7,0 e solução de sais biliares a 1% (m/v) e a pH 7,0.

Num tubo de ensaio foram adicionados 2 mL de extrato com 2 mL da solução de α -amilase e deixou-se reagir durante 2 minutos a 37 °C (simulação

das condições na boca). Da solução anterior foram transferidos 2 mL, para um novo tubo de ensaio, onde foram adicionados 2 mL da solução de pepsina deixando reagir durante 2 horas a uma temperatura de 37 °C (simulação das condições no estômago). Por último, foram adicionados 2 mL da solução anterior, 1 mL da solução de pancreatina e 1 mL da solução de sais biliares, deixando reagir durante 2 horas a uma temperatura de 37 °C (simulação das condições no intestino delgado).

No final de cada etapa foram avaliados o teor de compostos fenólicos, pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, e a atividade antioxidante, pelo método ABTS.

2.6. Tratamento dos dados

Todos os resultados realizados neste estudo foram sujeitos a uma análise recorrendo ao Microsoft Excel 2010. Para efeito de tratamento dos dados obtidos, estes foram apresentados na forma de média \pm desvio padrão. As retas de calibração e correção foram determinadas por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.



3.1. Propriedades físico-químicas das camarinhas

3.1.1. Determinação das características biométricas

Os resultados obtidos, relativos às características biométricas das camarinhas, encontraram-se representados na Tabela 2.

No que diz respeito ao valor médio da altura (8,6 mm), este valor pode ser considerado semelhante ao descrito por Larrinaga (2010) (8,2 mm) e encontra-se dentro do intervalo obtido por Cancela (2005) (5,0 - 12,0 mm).

Relativamente ao valor médio do diâmetro (9,4 mm) foi possível verificar que este valor apresentou-se similar ao descrito por Larrinaga (2010) (9,5 mm), Cancela (2004) (9,0 mm) e ligeiramente superior ao intervalo obtido por Santos *et al.*, (2014) e Oliveira & Dale (2012) (5,0 - 8,0 mm).

Tabela 2: Características biométricas das camarinhas.

Características biométricas	Resultados (média±desvio padrão)
Altura (mm)	8,6±0,8
Diâmetro (mm)	9,4±0,7
Calibre (cm)	0,9±0,1
Volume (cm³)	0,4±0,1
Massa (g)	0,7±0,1
Massa específica (g/cm³)	1,7±0,2

Em relação ao valor médio da massa (0,7 g), verificou-se ser superior ao descrito por Oliveira & Dale (2012) (0,3 – 0,5 g).

Segundo os resultados desta caracterização, de uma forma geral, foi possível averiguar que as camarinhas avaliadas apresentaram valores superiores aos reportados na literatura, em todos os parâmetros físicos analisados (altura; diâmetro; peso), o que poderá indicar que o tipo de variedade em estudo e as condições edafoclimáticas da região podem estar na origem das diferenças encontradas.

3.1.2. Determinação da cor

Os valores relativos aos parâmetros de caracterização da cor (L^* , a^* , b^* , tonalidade e chroma) das camarinhas encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros avaliados da cor.

Amostra	Resultados (média±desvio padrão)				
	Coordenadas Cartesianas			Coordenadas Cilíndricas	
	L^*	a^*	b^*	Tonalidade (h°)	Chroma (C)
Camarinha	79,8±2,8	1,3±2,1	5,9±1,0	77,3±13,4	6,3±1,5

No que diz respeito ao valor de L^* (79,8) foi possível verificar que as camarinhas avaliadas possuem uma cor clara, pois o valor obtido em L^* , encontrou-se mais próximos do valor +100 (branco), do que do valor zero (preto).

Relativamente aos valores de a^* (1,3) e b^* (5,90) observou-se que tratam-se de valores positivos, e portanto vermelho e amarelo, respetivamente, não sendo no entanto estas cores dominantes já que os valores são próximos de zero.

De acordo com os resultados obtidos foi possível observar que as camarinhas avaliadas tinham uma tonalidade perto da zona amarela/esverdeada (77,3), o que difere ligeiramente do que está descrito por Oliveira & Dale (2012) como sendo de coloração branca a rosada.

3.1.2. Determinação da textura

Os resultados obtidos na determinação da textura das camarinhas encontram-se representados na Tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros avaliados para textura das camarinhas.

Amostra	Resultados (média±desvio padrão)	
	Dureza (N)	Elasticidade (mm)
Camarinha	1,9±0,4	2,9±0,7

No que diz respeito aos valores da dureza (1,9 N) e da elasticidade (2,9 mm) foi possível verificar que as camarinhas têm uma maior elasticidade do que dureza, ou seja, a superfície das camarinhas possui alguma resiliência, no

entanto não possui grande resistência à compressão quando lhes é aplicada uma força de rutura.

3.1.3. Caraterização química das camarinhas

Os resultados obtidos da caraterização química das camarinhas encontram-se representados na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados das análises químicas às camarinhas.

Análises químicas		Resultados (média±desvio padrão)
Humidade (%)	Amostra Fresca	87,9±1,0
	Amostra Liofilizada	11,6±0,0
*Fibra Total (g/100 g ms)		36,5±1,9
Vitamina C (mg ácido ascórbico/100 g)		2,8±0,5
*Açúcares (g/100 g ms)	Totais	83,6±4,7
	Redutores	62,8±0,8
Teor de Sólidos Solúveis (SSc) (°Brix)		6,3±0,3
Acidez Titulável (TAc) (g Ácido tartárico/100 g)		1,4±0,1
Índice de Maturação (°Brix/TAc)		4,5±0,0

* Resultados expressos em matéria seca.

Os valores médios obtidos na determinação da humidade das camarinhas frescas e após o processo de liofilização foram de 87,9% e 11,6%, respetivamente. Relativamente à percentagem da humidade da amostra fresca pode ser considerada ligeiramente superior ao referenciado por Clavijo *et al.* (2003) (75,0%) e Santos *et al.* (2014) (83,4%).

Os resultados mostram que a média obtida em teor de fibra foi de 36,5 g/100 g ms. Segundo o descrito por Cancela (2002), as camarinhas são pequenos frutos muito ricos em fibra. O teor de fibra, neste fruto, poderá estar associado às grainhas que cada camarinha aporta.

No que diz respeito ao valor obtido em vitamina C (2,8 mg ácid.ascórbico/100 g), este valor apresentou-se inferior ao descrito por Pimpão *et al.* (2012) (5,4 mg ácid.ascórbico/100 g).

Relativamente ao teor em açúcares averigou-se que os valores foram de 83,6 e 62,8% para açúcares totais e redutores, respetivamente. Em relação ao teor de açúcares totais, este valor foi superior ao descrito por Clavijo *et al.* (2003) (77,1%). Em relação ao valor obtido de ° Brix (6,3) verificou-se ser semelhante descrito por Santos *et al.* (2014) e por Pimpão *et al.* (2012) (6,8).

No que diz respeito aos valores da acidez (1,4 g ácido tartárico/100 g) e da razão de maturação (4,5) foi possível averiguar que tanto a acidez como a razão da maturação apresentaram-se superiores ao obtido por Pimpão *et al.* (2012) (0,9 g ácido tartárico/100 g; 0,8 respetivamente).

De modo geral, foi possível verificar que os valores obtidos nesta caracterização química foram superiores aos reportados na literatura, o que poderá indicar, que as características biométricas, o estado de maturação das camarinhas e o tipo de metodologia adotado podem estar na origem nas diferenças encontradas.

3.2. Compostos fenólicos totais

A Figura 19 mostra a percentagem de compostos fenólicos totais (CFT) obtidos nas duas extrações realizadas com cada um dos diferentes solventes,

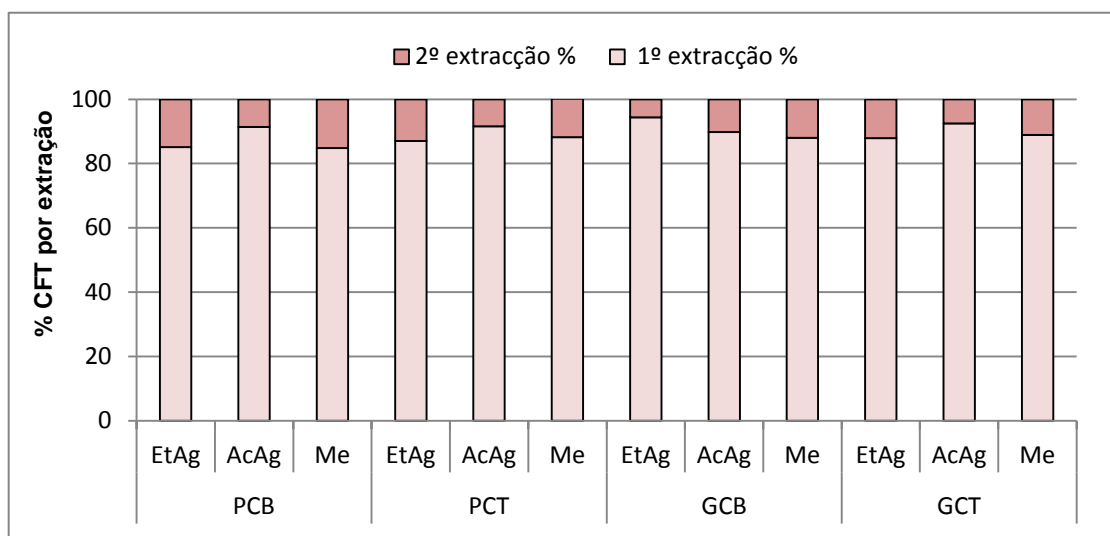


Figura 20: Compostos fenólicos totais obtidos nas duas extrações (CFT - compostos fenólicos totais; EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).

etanol:água (EtAg), acetona:água (AcAg) e metanol (Me), nas amostras de polpa grainhas.

Segundo os resultados observados na Figura 19 foi possível observar que os valores da 1ª extração foram muito superiores relativamente aos da 2ª extração. Na primeira extração foram extraídos entre 85-94%, do total de compostos fenólicos quantificados nas duas extrações. Sendo que o maior valor (94%), ocorreu na amostra grainha camarinha branca (GCB), com a solução EtAg e o menor (85%), na polpa camarinha branca (PCB), com as soluções EtAg e metanol. Ao avaliar a 2ª extração verificou-se que os valores situavam-se entre 6-15% (Figura 19).

Os resultados da Figura 20 mostram os valores dos compostos fenólicos totais, expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de polpa ou grainha, presentes nas diferentes amostras e de acordo com a afinidade ao solvente utilizado no processo.

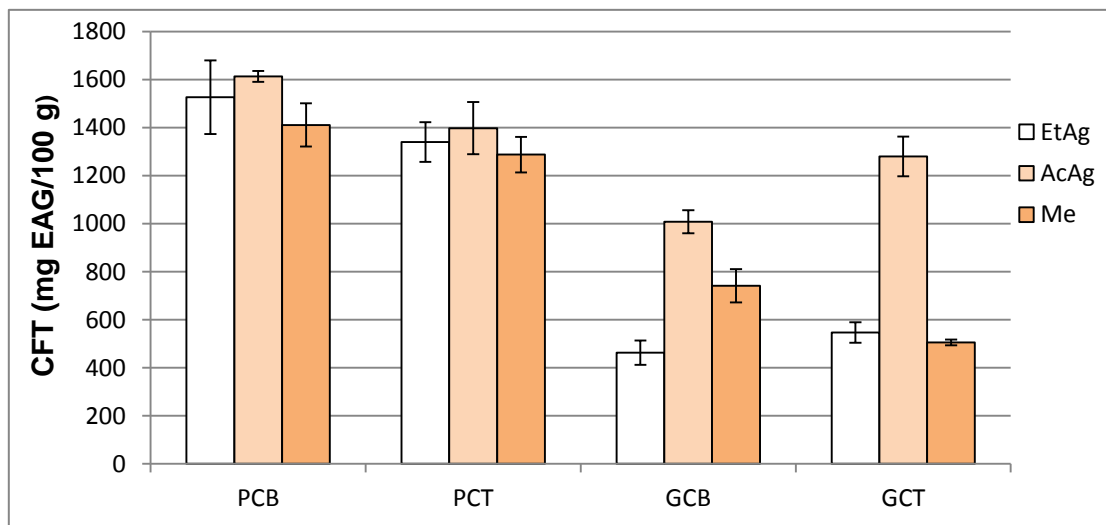


Figura 21: Quantidade de compostos fenólicos totais consoante o tipo de solvente (EAG - Equivalentes de ácido gálico; CFT - compostos fenólicos totais; EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me - metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).

Neste estudo foi possível constatar que para as amostras polpa camarinha branca (PCB) e polpa camarinha translúcida (PCT), a solução AcAg foi a mais eficiente na extração de compostos fenólicos totais, com valores médios de 1614,1 mg EAG/100 g e de 1398,1 mg EAG/100 g, respetivamente seguindo-se a solução de EtAg com 1527,1 mg EAG/100 g e 1340,6 mg

EAG/100 g, respetivamente e por fim, a de metanol com 1411,3 mg EAG/100 g e 1288,0 mg EAG/100 g de forma respetiva (Figura 20).

No que diz respeito aos extratos das amostras PCB e PCT verificou-se que os valores de compostos fenólicos totais foram similares independentemente do solvente usado, sendo a camarinha branca ligeiramente mais rica, do que a camarinha translúcida. Os valores em compostos fenólicos na PCB variaram entre 1411,3 e 1614,1 mg EAG/100 g, enquanto na amostra PCT variaram entre 1288,0 e 1398,1 mg EAG/100 g. Contudo o extrato acetona:água (AcAg) exibiu um ligeiro destaque comparativamente aos outros extratos. Neste trabalho, os extratos AcAg das PCB e PCT, obtiveram os valores mais elevados, 1614,1 mg EAG/100 g e 1398,1 mg EAG/100 g, de amostra liofilizada, o que corresponde a 1825,9 mg EAG/100 g e 1585,7 mg EAG/100 g em matéria seca respetivamente, valores estes que verificaram-se ser inferior ao descrito por León-González *et al.* (2013) (7318,9 mg EAG/100 g matéria seca). Desta forma, foi possível verificar que o método de extração, desta análise adotado pelo autor (acetona:água: ácido fórmico) teve uma maior eficiência que o método adotado por este estudo (AcAg) observando-se desta forma, extratos menos ricos em compostos fenólicos. No caso do extrato da PCB, com EtAg (1527,1 mg EAG/100 g de amostra liofilizada; 1727,6 mg EAG/100 g matéria seca) este apresentou um valor superior que o reportado por Macedo *et al.* (2013) (1581,0 mg EAG/100 g matéria seca). As diferenças ocorridas entre os valores obtidos e os reportados na literatura poderão estar na origem no tipo de variedade estudada, no teor em acidez, no grau de maturação, nas condições edafoclimáticas da região em estudo e nos métodos de extração adotados.

Segundo um estudo similar realizado, em outras matrizes de pequenos frutos, verificou-se que as camarinhas possuem teores em compostos fenólicos totais inferiores (cerca de duas a quatro vezes menos) (León-González *et al.*, 2013), quando comparadas aos mirtilos (*Ericaceae*); amoras, morangos e framboesas (*Rosaceae*) (Jakobek *et al.*, 2007). Estas diferenças deverão estar relacionadas com as diferentes quantidades em compostos fenólicos.

Relativamente aos valores observados da GCB e GCT constatou-se, que os extratos AcAg destacaram-se por apresentarem teores mais elevados

em compostos fenólicos totais, com os valores médios de 1008,4 mg EAG/100 g e de 1280,7 mg EAG/100 g, respetivamente (Figura 20).

Os resultados obtidos mostram que as polpas das camarinhas apresentavam quantidades superiores de compostos fenólicos, quando comparada com as respetivas grainhas.

3.2.1. Orto- difenóis

A Figura 22 mostra a percentagem de orto-difenóis obtidos nas duas extrações realizadas com cada um dos diferentes solventes (EtAg; AcAg e Me), nas amostras de polpa e de grainhas de camarinhas brancas e translúcidas.

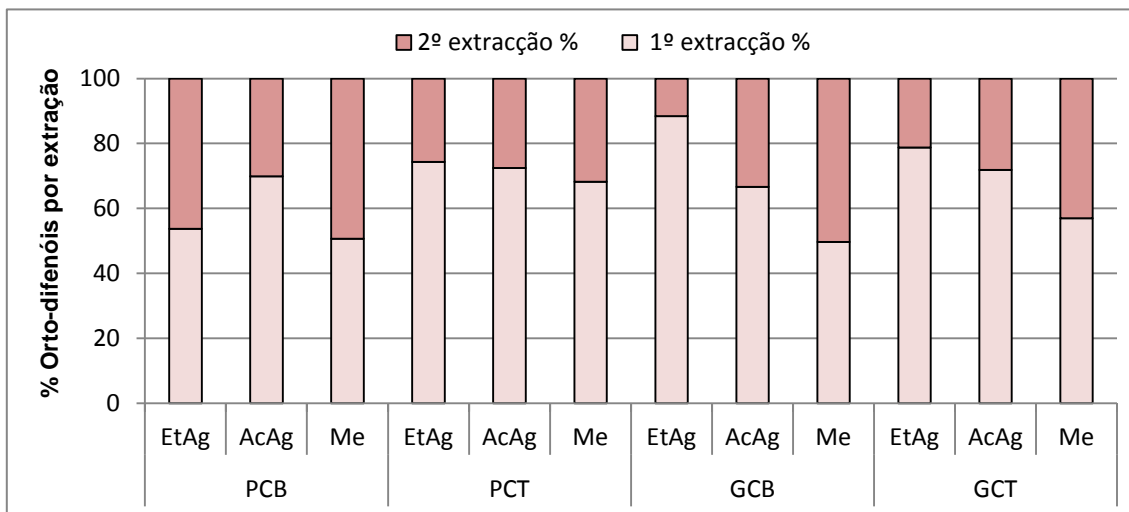


Figura 22: Orto-difenóis obtidos nas duas extrações (EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCT - grainha de camarinha branca).

Segundo os resultados observados na Figura 22, na primeira extração foram extraídos entre 50-88%, do total de orto-difenóis quantificados nas duas extrações. O valor mais elevado (88%) ocorreu no extrato EtAg da amostra GCB e o mais baixo (50%) no extrato de metanol da amostra GCT. Ao avaliar a 2ª extração verificou-se que os valores situavam-se entre 12-50% (Figura 22).

Os resultados da Figura 23 mostram os valores dos orto-difenóis, expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de polpa ou grainha, presentes nos diferentes extratos obtidos.

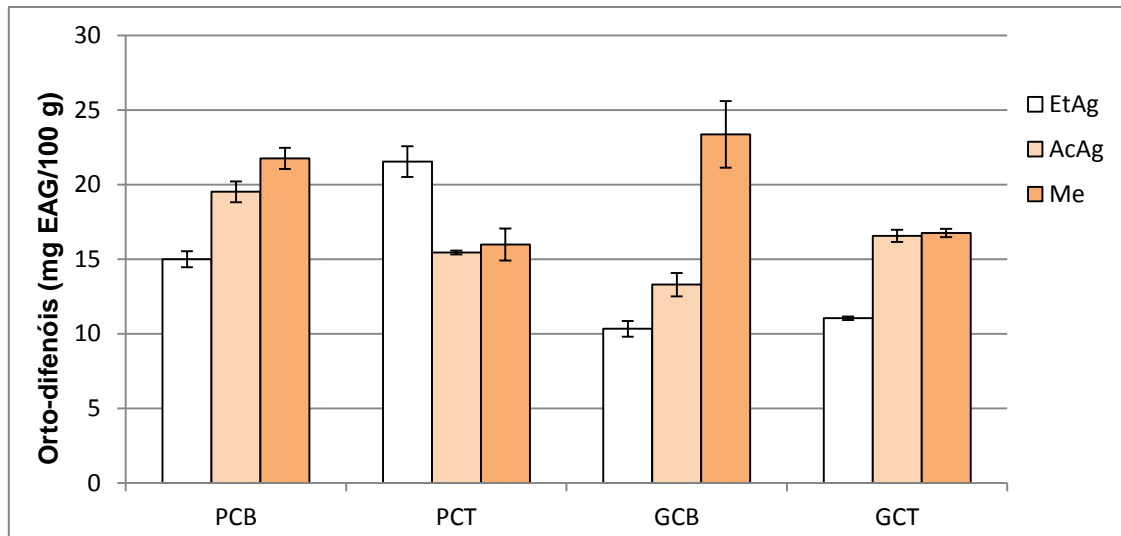


Figura 23: Quantidade de orto-difenóis consoante o tipo de solvente (EAG - Equivalentes de ácido gálico; EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).

Neste estudo foi possível constatar, que para as amostras PCB e GCB, o solvente metanol foi mais eficiente na extração de orto-difenóis, com valores médios de 21,8 mg EAG/100 g e de 23,4 mg EAG/100 g, respetivamente. Por outro lado, quando se utilizou AcAg extraíram-se 19,5 mg EAG/100 g (PCB) e 13,3 mg EAG/100 g (GCB). Por fim, com a solução EtAg extraíram-se 15,0 mg EAG/100 g (PCB) e 10,3 mg EAG/100 g (GCB) (Figura 23).

No que diz respeito aos extratos das amostras PCB e PCT verificou-se que os valores de orto-difenóis foram semelhantes entre si, tendo a polpa de camarinha branca sido ligeiramente mais rica nestes compostos, do que a polpa camarinha translúcida. No caso da PCB os resultados variaram entre 15,0 e 21,8 mg EAG/100 g enquanto na amostra PCT variaram entre 15,4 e 21,5 mg EAG/100 g. Os extratos de metanol e EtAg, nestas amostras, exibiram um pequeno destaque comparativamente aos outros extratos em estudo.

Relativamente aos valores observados da GCB e GCT constatou-se que os extratos de metanol destacaram-se por apresentar um maior teor em

orto-difenóis, com os valores médios de 23,4 mg EAG/100 g e de 16,8 mg EAG/100 g, respectivamente (Figura 23).

Os resultados obtidos mostram que as polpas das camarinhas apresentavam quantidades superiores de orto-difenóis, em quase todos os extratos, quando comparada com as respectivas grainhas.

Os extratos de metanol, de um modo geral, exibiram um destaque perante as amostras analisadas, o que poderá indicar que os orto-difenóis possuem uma maior afinidade com o solvente metanol. No entanto não foram encontrados valores na literatura para que fosse possível realizar uma comparação com resultados obtidos neste estudo.

3.2.2. Flavonóides

A Figura 24 mostra a percentagem de flavonóides obtidos nas duas extrações realizadas com cada um dos diferentes solventes (EtAg, AcAg e Me), nas amostras de polpa e de grainhas de camarinhas brancas e translúcidas.

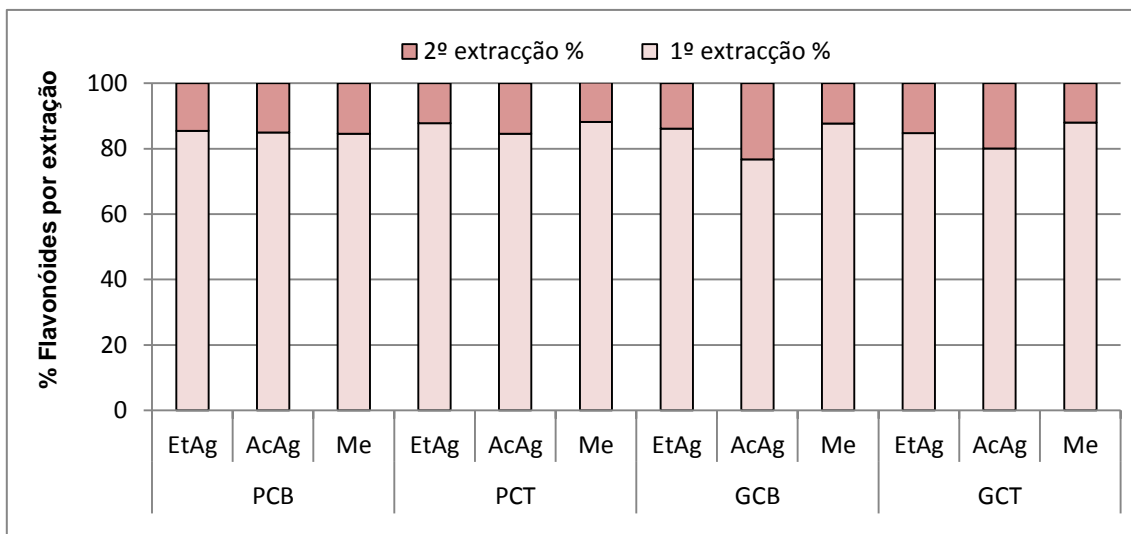


Figura 24: Flavonóides obtidos nas duas extrações (EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCT - grainha de camarinha branca).

Na primeira extração foram extraídos entre 77-88% do total de flavonóides quantificados nas duas extrações, percentagens muito superiores relativamente aos da 2ª extração. Sendo que os valores mais elevados (88%) ocorreram nas amostras PCT, GCB e GCT, com as soluções de EtAg e metanol. O menor valor (77%) ocorreu na GCB com a solução de AcAg. Ao

avaliar a 2ª extração verificou-se que os valores situavam-se entre 12-23% (Figura 24).

Os resultados dos teores flavonóides, expressos em miligramas de equivalentes de quercitina por 100 gramas de polpa ou grainha presentes nos diferentes extratos estão apresentados na Figura 25.

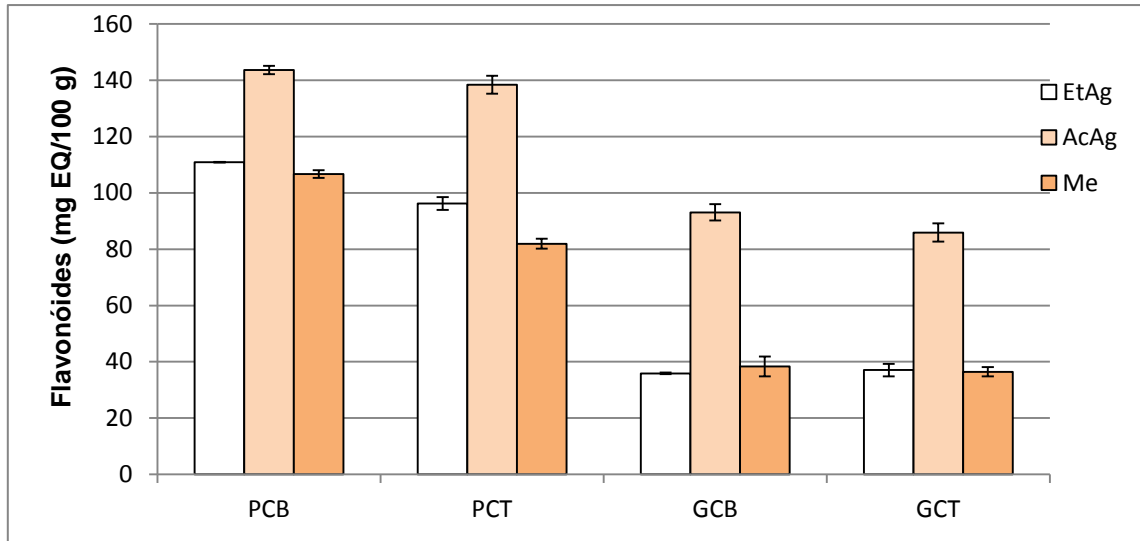


Figura 25: Quantidade de flavonóides consoante o tipo de solvente (EQ - Equivalentes de Quercitina; EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).

Neste estudo foi possível constatar que, para as todas as amostras em estudo, os extratos de AcAg exibiram um maior teor em flavonóides, relativamente aos outros extratos.

Nesta avaliação foi possível verificar que, para as amostras PCB e PCT, a solução AcAg foi a que apresentou extrações mais eficientes em flavonóides, com valores médios de 143,7 mg EQ/100 g e de 138,4 mg EQ/100 g respetivamente, seguindo-se, as extrações com etanol:água, com os valores médios de 110,9 mg EQ/100 g e 96,2 mg EQ/100 g, respetivamente. Por fim, as extrações de metanol, com os valores de 106,6 mg EQ/100 g e 81,9 mg EQ/100 g mostraram-se as menos eficientes (Figura 25). Relativamente aos extratos das amostras PCB e PCT verificou-se que os valores de flavonóides foram semelhantes independentemente do solvente usado, no entanto a PCB apresentou-se ligeiramente mais rica nestes compostos. No caso da PCB, os resultados variaram entre 106,6 e 143,7 mg EQ/100 g, enquanto na amostra PCT variaram entre 81,9 e 138,4 mg EQ/100 g.

Os extratos de AcAg das amostras PCB e PCT, obtiveram os valores médios de 143,7 mg EQ/100 g e de 138,4 mg EQ/100 g (amostra liofilizada), o que corresponde a 162,6 mg EQ/100 g e a 156,6 mg EQ/100 g em matéria seca respectivamente, valores estes que são superiores ao descrito por León-González *et al.*, (2013) (63,83 mg/100 g matéria seca). Por outro lado o teor em flavonóides das extrações de PCB e PCT, com etanol:água (110,9 e 96,2 mg EQ/100 g respectivamente) apresentaram-se semelhantes ao teor em quercitina obtido por Pimpão *et al.* (2013) (97,8 mg/100 g). As diferenças entre os valores obtidos e os reportados na literatura poderão estar relacionados com o tipo de variedade estudada, o grau de acidez, o grau de maturação, as condições edafoclimáticas da região em estudo e os métodos de extração adotados.

Relativamente aos valores observados na GCB e GCT constatou-se que os extratos de AcAg destacaram-se por apresentar maiores teores em flavonóides, com os valores médios de 93,1 mg EQ/100 g e de 85,9 mg EQ/100 g, respectivamente (Figura 25).

Os resultados obtidos mostram que as polpas das camarinhas apresentavam quantidades superiores de flavonóides, quando comparadas com as respectivas grainhas.

3.2.3. Taninos

A Figura 26 mostra a percentagem de taninos obtidos nas duas extrações realizadas com cada um dos diferentes solventes (EtAg, AcAg e Me), nas amostras de polpa e de grainhas de camarinhas brancas e translúcidas.

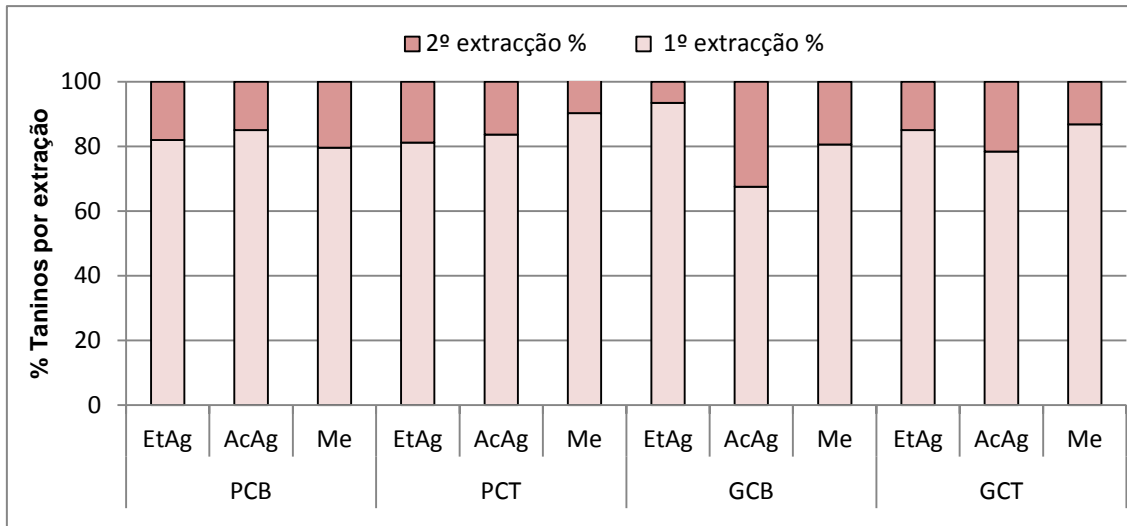


Figura 26: Taninos obtidos nas duas extrações (EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).

A percentagem de taninos obtidos nos primeiros extratos variaram entre 68-94%, do total de taninos quantificados. O maior valor (94%) foi verificado no extrato EtAg da amostra GCB, e o menor valor (68%) no extrato AcAg da mesma amostra. Ao avaliar a 2ª extração verificou-se que os valores situavam-se entre 6-32% (Figura 26).

Os resultados da Figura 27 mostram os valores dos taninos, expressos em miligramas por 100 gramas de polpa ou grainha presentes nas diferentes amostras de acordo com os solventes utilizados no processo.

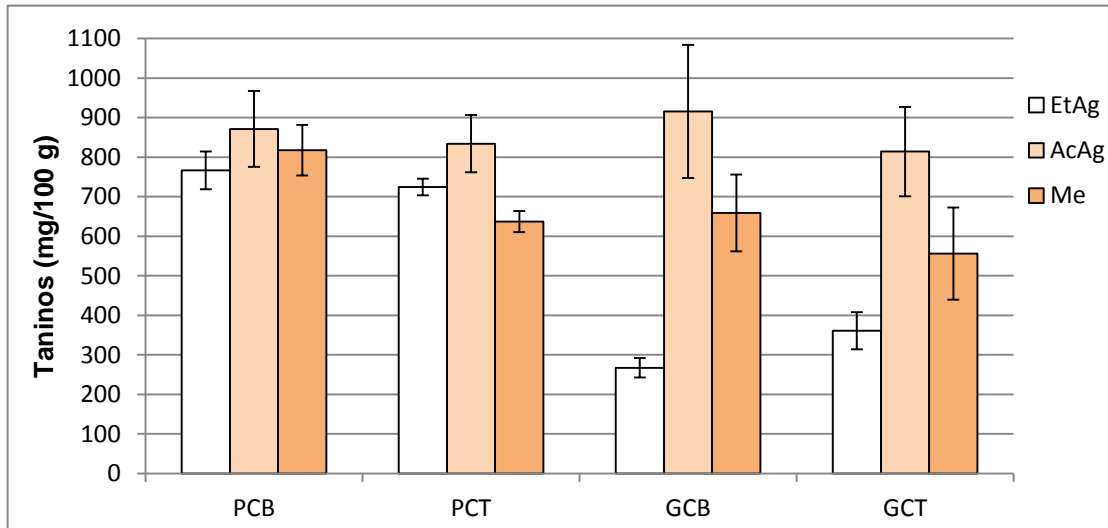


Figura 27: Quantidade de taninos consoante o tipo de solvente (EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCT - grainha de camarinha branca).

Segundo os resultados obtidos na Figura 27 foi possível observar que as extrações com acetona:água foram as mais eficientes a extrair taninos em todas as amostras em estudo. Verificou-se que para as amostras PCB e PCT, os extratos de AcAg obtiveram os maiores valores médios de 871,5 mg/100 g e de 834,1 mg/100 g, respetivamente, seguindo-se a extrações com metanol 817,7 mg/100 g (PCB) e as de etanol:água 724,8 mg/100 g (PCT). Também foi possível observar que o extrato de metanol da PCB (817,7 mg EAG/100 g) teve um maior destaque comparativamente com os outros extratos de metanol (Figura 27).

Relativamente aos valores de taninos observados na GCB e GCT constatou-se que os extratos de AcAg destacaram-se por apresentar um teor mais elevado em taninos, com valores médios de 915,7 mg/100 g e de 834,1 mg/100 g, respetivamente (Figura 27). Neste trabalho, os extratos das GCB e GCT, com AcAg obtiveram os valores de 915,7 e de 814,2 mg/100 g (amostra liofilizada), o que corresponde a 1035,9 e a 921,0 mg/100 g, em matéria seca. Relativamente aos extratos de GCB e GCT, com EtAg verificou-se que se obteve valores de 267,3 e 361,1 mg/100 g (amostra liofilizada), o que

corresponde a 302,4 e 408,5 mg/100 g em matéria seca, respetivamente. Os valores obtidos dos extratos com AcAg e EtAg apresentaram-se semelhantes a um estudo realizado em grainhas de uvas, onde foi possível averiguar que os valores de taninos condensados (proantocianidinas), em matéria seca, foram de 830,0 mg/100 g (acetona a 50%) e de 430,0 mg/100 g (etanol a 50%) (Bosso *et al.*, 2016).

Os resultados obtidos mostram que os extratos de AcAg destacaram-se em todas as amostras analisadas, o que poderá indicar que os taninos possuem uma maior afinidade com a solução AcAg. Por outro lado, no caso particular dos extratos com EtAg, as polpas apresentaram extratos muito ricos em taninos, o que não se verificou nas amostras das grainhas. Esta diferença poderá estar relacionada com a maior afinidade deste solvente com determinados grupos de taninos mais presentes nas polpas. Relativamente às restantes diferenças encontradas entre os valores obtidos e os reportados pela literatura poderão estar relacionadas com o tipo da variedade estudada, o grau de acidez, o grau de maturação, as condições edafoclimáticas da região em estudo e os métodos de extração adotados.

3.3. Atividade antioxidante

3.3.1. Método DPPH

A Figura 28 mostra a percentagem da atividade antioxidante dos extratos, determinada pelo método DPPH nos extratos das amostras de polpa

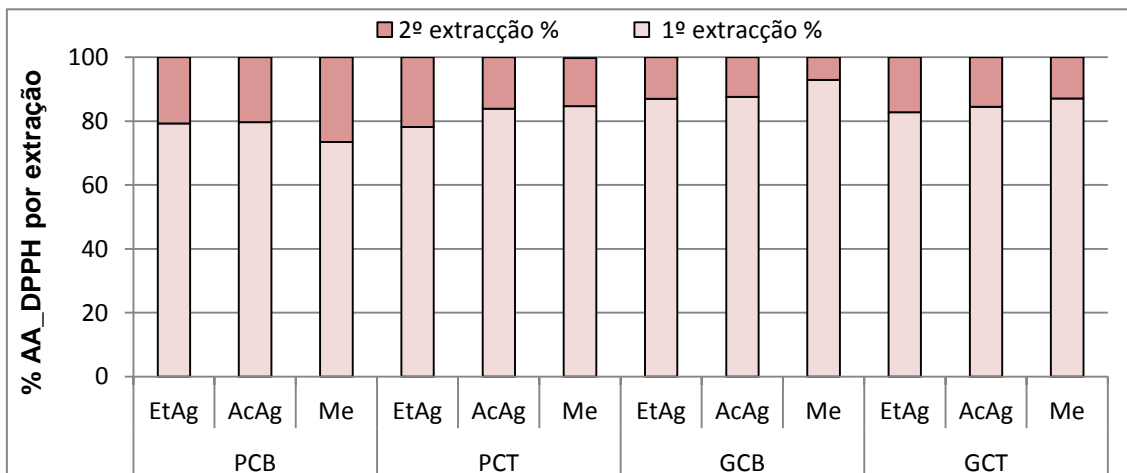


Figura 28: Atividade antioxidante pelo método DPPH resultante das duas extrações (EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCT - grainha de camarinha branca).

e de grainhas de camarinhas brancas e translúcidas com cada um dos diferentes solventes (EtAg, AcAg e Me).

Segundo os resultados observados na Figura 28 foi possível observar que os valores da atividade antioxidante da 1ª extração foram muito superiores relativamente aos da 2ª. O valor mais elevado (93%) ocorreu na amostra GCB e o menor valor (73%) ocorreu na PCB, ambas com o solvente metanol. Ao avaliar a 2ª extração verificou-se que os resultados situaram-se entre 7-27% (Figura 28).

Os resultados da Figura 29 mostram os valores da atividade antioxidante (AA) pelo método DPPH, expressos em micromoles de equivalentes de trolox por grama de polpa ou grainha, presentes nas diferentes amostras e de acordo com a afinidade aos solventes utilizados no processo.

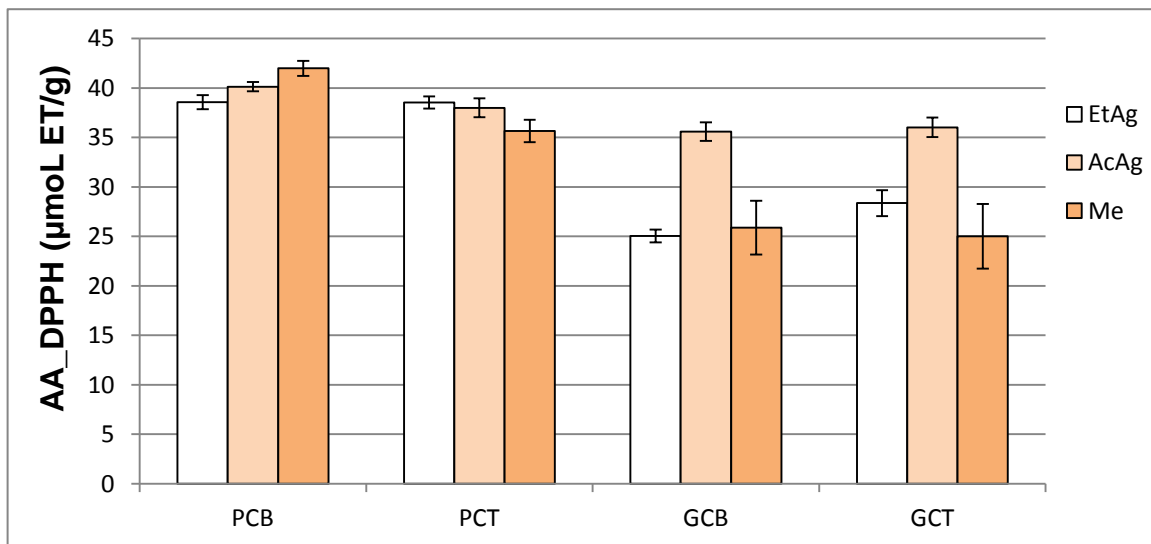


Figura 29: Valores da atividade antioxidante pelo método DPPH resultante do tipo de solvente (ET - Equivalentes de trolox; EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCT - grainha de camarinha branca).

Neste estudo foi possível averiguar que os extratos de metanol da amostra PCB (42,0 µmol ET/g) e o de EtAg da amostra PCT (38,6 µmol ET/g) foram os que apresentaram uma maior atividade antioxidante, seguindo-se os extratos de AcAg com, 40,1 µmol ET/g (PCB) e 38,0 µmol ET/g (PCT). No que diz respeito aos extratos das amostras de polpas constatou-se que os valores da atividade antioxidante foram muito semelhantes entre si, independentemente do solvente usado. No entanto, a polpa de camarinha

branca apresentou uma atividade antioxidante ligeiramente superior em relação à polpa de camarinha translúcida.

Segundo um estudo, realizado em outras matrizes de pequenos frutos, verificou-se que as camarinhas deste estudo têm uma atividade antioxidante, pelo método do DPPH (42,0 $\mu\text{mol ET/g}$), muito equivalente às amoras (41,9 $\mu\text{mol ET/g}$) e muito superior às framboesas (18,6 $\mu\text{mol ET/g}$), aos morangos (6,1 $\mu\text{mol ET/g}$) e às cerejas (4,2 $\mu\text{mol ET/g}$) (Jakobek *et al.*, 2007). No entanto, no caso dos mirtilos constatou-se que estes apresentam uma atividade antioxidante muito superior (125,5 $\mu\text{mol ET/g}$) (Jakobek *et al.*, 2007) às camarinhas. Relativamente às diferenças encontradas entre os valores obtidos e os reportados pela literatura poderão estar relacionadas como tipo de método adotado, com o tipo da variedade estudada, o grau de acidez, o grau de maturação e com as condições edafoclimáticas da região em estudo.

Relativamente aos valores observados da GCB e GCT constatou-se que os extratos de AcAg destacaram-se por apresentar uma maior atividade antioxidante, como valores médios de 35,5 $\mu\text{mol ET/g}$ e de 36,0 $\mu\text{mol ET/g}$, respetivamente (Figura 29).

Os resultados obtidos mostram que as polpas das camarinhas apresentavam uma maior atividade antioxidante quando comparadas com as suas respetivas grainhas. No entanto, em relação aos extratos de AcAg, estes apresentaram-se semelhantes com os respetivos extratos de AcAg das polpas.

As extrações realizadas com acetona:água e metanol exibiram um pequeno destaque, o que poderá indicar que existe uma maior afinidade com estes solventes.

3.3.2. Método ABTS

A Figura 30 mostra a percentagem da atividade antioxidante obtida pelo método ABTS nas duas extrações realizadas nas amostras de polpa e de grainhas de camarinhas brancas e translúcidas, com cada um dos diferentes solventes (EtAg, AcAg e Me).

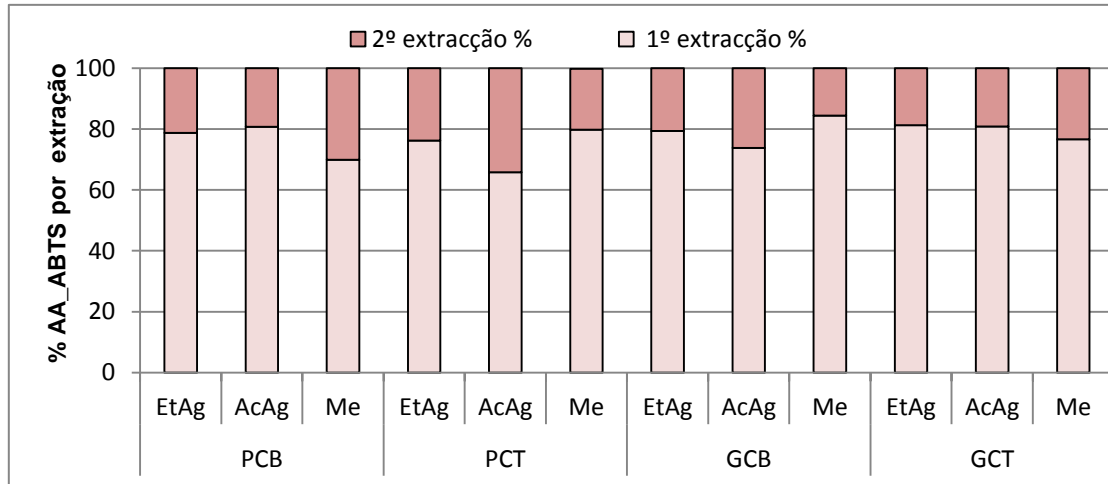


Figura 30: Atividade antioxidante pelo método ABTS resultante das duas extrações (EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me - metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).

Segundo os resultados observados na Figura 30 é possível afirmar que os valores da 1ª extração foram superiores relativamente aos da 2ª. Na primeira extração os resultados variaram entre 66-84% do total da atividade antioxidante quantificada nas duas extrações. O maior valor (84%) ocorreu na amostra GCB, com solvente metanol e o menor valor (66%) ocorreu na PCT, com solvente AcAg. Ao avaliar a 2ª extração verificou-se que os valores situavam-se entre 16-34% (Figura 30).

Os valores da atividade antioxidante pelo método ABTS, expressos em micromoles de equivalentes de trolox por grama de polpa ou grainha, presentes nos diferentes extratos estão apresentados na Figura 31.

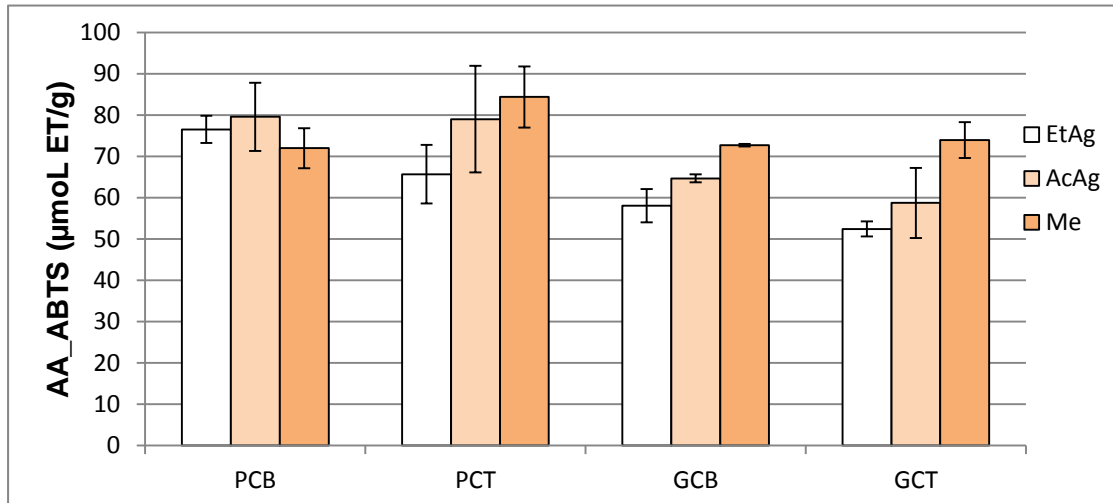


Figura 31: Valor da atividade antioxidante pelo método ABTS resultante do tipo de solvente (ET - Equivalentes de trolox; EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).

Nesta avaliação foi possível verificar que, para as amostras PCB e PCT as soluções de AcAg (79,6 $\mu\text{mol ET/g}$) e metanol (88,4 $\mu\text{mol ET/g}$), respetivamente foram as que apresentaram uma maior atividade antioxidante, seguindo-se os extratos de EtAg com 76,6 $\mu\text{mol ET/g}$ (PCB) e AcAg com 79,0 $\mu\text{mol ET/g}$ (PCT). Por fim, os extratos de metanol com 72,0 $\mu\text{mol ET/g}$ (PCB) e EtAg com 65,7 $\mu\text{mol ET/g}$ (PCT) (Figura 31). No que diz respeito aos extratos das amostras de polpas verificou-se que os valores da atividade antioxidante foram semelhantes, independentemente do solvente usado. No entanto, a polpa de camarinha translúcida apresentou uma atividade antioxidante ligeiramente superior em relação à polpa de camarinha branca.

Segundo um estudo, realizado em outras matrizes de pequenos frutos, verificou-se que as camarinhas deste estudo obtiveram valores de atividade antioxidante, por ABTS (88,4 $\mu\text{mol ET/g}$), bastante superiores às amoras (23,9 $\mu\text{mol ET/g}$), framboesas (12,1 $\mu\text{mol ET/g}$), morangos (12,1 $\mu\text{mol ET/g}$), cerejas (13,6 $\mu\text{mol ET/g}$) e mirtilos (53,3 $\mu\text{mol ET/g}$) (Jakobek *et al.*, 2007). As diferenças encontradas entre os valores obtidos e os reportados pela literatura poderão estar relacionadas com o tempo de reação do método (Jakobek *et al.*,

2007), o tipo da variedade estudada, o grau de acidez, o grau de maturação e com as condições edafoclimatéricas da região em estudo.

No que diz respeito aos valores observados da GCB e GCT constatou-se que os extratos de metanol destacaram-se por apresentar uma maior atividade antioxidante, com valores médios de 73,9 $\mu\text{mol ET/g}$ e de 72,7 $\mu\text{mol ET/g}$, respetivamente (Figura 31).

As extrações realizadas com acetona:água e com metanol exibiram um pequeno destaque o que poderá indicar que existe uma maior afinidade com estas soluções. Os resultados obtidos mostram que as polpas das camarinhas apresentavam uma maior atividade antioxidante quando comparada com as respetivas grainhas.

3.3.2. Correlação entre a atividade antioxidante e os compostos fenólicos totais

A relação existente entre os compostos fenólicos totais e a sua atividade antioxidante pelo método DPPH foi obtida segundo a reta de correlação da Figura 32.

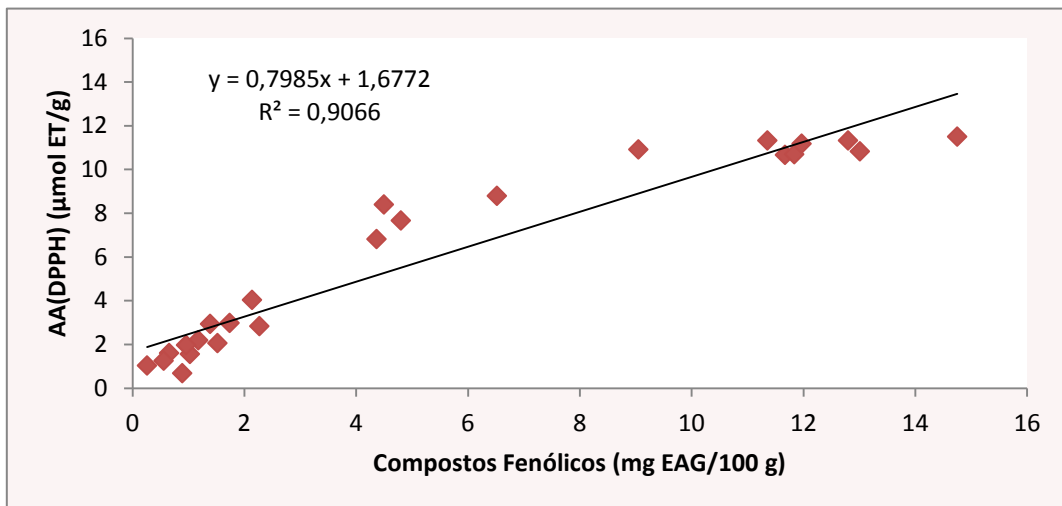


Figura 32: Reta de correlação entre a atividade antioxidante pelo método DPPH e o teor em compostos fenólicos.

No que diz respeito ao valor de r^2 (0,9066), obtido nesta avaliação, verificou-se que existe uma correlação positiva muito forte entre os resultados obtidos de compostos fenólicos com os do método DPPH.

A relação existente entre os compostos fenólicos totais e a sua atividade antioxidante, pelo método ABTS foi obtida segundo a reta de correlação da Figura 33.

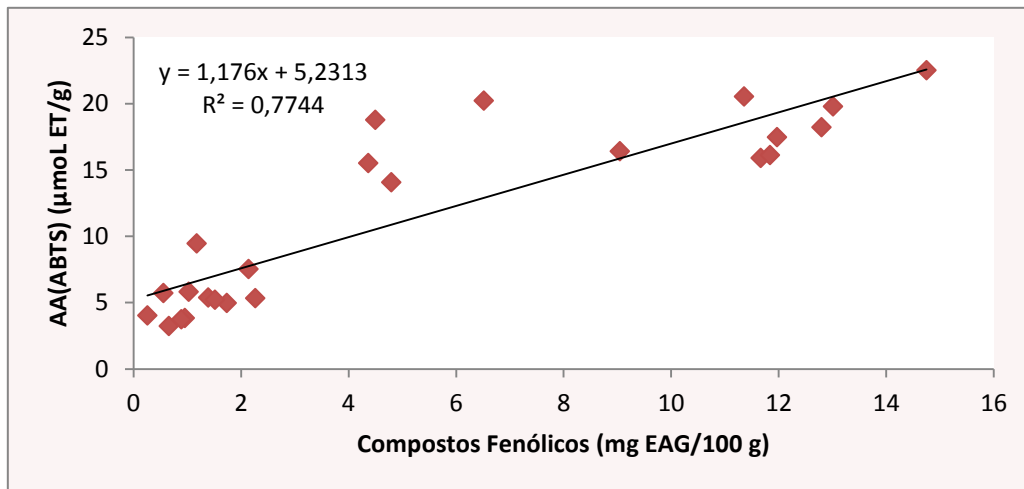


Figura 33: Reta de correlação entre a Atividade Antioxidante pelo método ABTS e o teor de compostos fenólicos.

Relativamente ao valor de r^2 (0,7744), obtido nesta avaliação, verificou-se que existe uma correlação positiva relativa entre os resultados obtidos dos compostos fenólicos com os do método ABTS.

O valor do r^2 obtido segundo o método DPPH (0,9066) apresentou-se superior ao do método ABTS (0,7744) o que poderá indicar certos compostos fenólicos presentes podem ser mais reativos e de forma mais repetível perante o método DPPH.

A Tabela 6 correlaciona os valores obtidos para as diferentes frações de compostos fenólicos, com a atividade antioxidante obtida pelos dois métodos.

Tabela 6: Valores de correlação da Atividade Antioxidante obtidos consoante as componentes fenólicas (EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol).

		R²/Tipo de extração		
	AA (Métodos)	EtAg	AcAg	Me
Compostos Fenólicos Totais	DPPH	0,9058	0,9463	0,8869
	ABTS	0,7848	0,9283	0,6929
Orto-difenóis	DPPH	0,7012	0,8908	0,2267
	ABTS	0,5382	0,8641	0,2150
Flavonóides	DPPH	0,8707	0,8484	0,8321
	ABTS	0,7435	0,8999	0,5928
Taninos	DPPH	0,9471	0,9265	0,9541
	ABTS	0,8179	0,8723	0,9093

No que diz respeito à relação entre a atividade antioxidante por DPPH e ABTS e os compostos fenólicos e orto-difenóis foi possível constatar que os extratos de AcAg foram os que apresentaram os maiores valores de correlação. Assim, os compostos fenólicos obtiveram as correlações de $r^2=0,9463$ (DPPH) e $r^2=0,9283$ (ABTS) e os orto-difenóis de $r^2=0,8908$ (DPPH) e $r^2=0,8641$ (ABTS).

Em relação à atividade antioxidante dos flavonóides verificou-se que os extratos de AcAg e metanol, pelo método ABTS foram os que obtiveram a maior ($r^2=0,8999$) e a menor ($r^2=0,5928$) correlação, respetivamente

Relativamente aos valores da atividade antioxidante dos taninos o extrato de metanol, pelo método DPPH destacou-se por apresentar o maior valor ($r^2=0,9541$) e o extrato de EtAg, pelo método ABTS o menor ($r^2=0,8179$). Desta forma, os resultados indicam que as propriedades antioxidantes dos extratos das polpas e grainhas das camarinhas se devem, tendencialmente, à presença de compostos fenólicos, orto-difenóis, flavonóides e taninos.

3.4. Bioacessibilidade “*in vitro*”

A simulação “*in vitro*” do processo digestivo foi aplicada aos primeiros extratos das amostras em estudo (polpa camarinha branca; polpa camarinha translúcida; grainha camarinha branca e grainha camarinha translúcida), provenientes dos três processos de extração. No final de cada etapa foi determinada a quantidade de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante permitindo calcular a variação destes parâmetros ao longo das etapas do trato gastrointestinal (boca, estômago e intestino).

3.4.1. Compostos fenólicos totais

A Tabela 7 mostra a percentagem de compostos fenólicos totais (CFT) que ficam disponíveis em cada etapa do trato. Perante os resultados obtidos observou-se que em todos extratos analisados ocorreu um decréscimo no conteúdo em compostos fenólicos ao longo de todas as etapas do trato gastrointestinal. Esse decréscimo foi maior na passagem pela boca (com perdas entre 33% e 47%), sendo que a transição pelo estômago é aquela que, aparentemente, originou uma menor perda (perdas entre 0% e 19%).

Tabela 7: Percentagem de compostos fenólicos totais disponíveis em cada etapa do trato gastrointestinal (EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).

Amostra		Etapas	Tipo de extração (média±desvio padrão)		
			EtAg	AcAg	Me
Polpas	PCB	Início	100±0	100±0	100±0
		Boca	64±3	62±3	58±2
		Estômago	41±1	39±1	39±2
		Intestino	20±1	21±1	13±1
	PCT	Início	100±0	100±0	100±0
		Boca	59±4	53±3	58±2
		Estômago	43±1	38±2	46±1
		Intestino	20±1	17±1	20±1
Grainhas	GCB	Início	100±0	100±0	100±0
		Boca	67±3	63±4	65±7
		Estômago	62±3	46±4	50±7
		Intestino	36±4	26±3	27±3
	GCT	Início	100±0	100±0	100±0
		Boca	63±7	66±11	54±3
		Estômago	61±7	46±7	54±9
		Intestino	34±2	22±3	33±4

No que diz respeito aos diferentes extratos das polpas de camarinhas brancas e translúcidas foi possível observar que os teores de CFT disponíveis na etapa boca variaram entre 58-64% e 53-59%, no estômago 39-41% e 38-46% e no intestino delgado 13-21% e 17-20%, respetivamente (Tabela 7).

Relativamente aos diferentes extratos das grainhas de camarinhas brancas e translúcidas foi possível observar que os teores de CFT retidos na etapa boca variaram entre 63-67% e 54-66%, no estômago 46-62% e 46-61% e no intestino delgado 27-36% e 22-34%, respetivamente (Tabela 7).

Neste estudo verificou-se que ocorreu uma ligeira tendência para uma maior perda de compostos fenólicos totais nas amostras das polpas, em comparação com as grainhas (Tabela 7). Desta forma, poderá indicar que os compostos fenólicos, maioritariamente presentes nas grainhas diferenciam-se ligeiramente dos das polpas e que estes possuem uma maior estabilidade às condições das diferentes etapas do trato gastrointestinal.

Nesta simulação, tanto nas amostras de polpa como nas de grainha, quando foi adicionada a α -amilase (simulação na boca) ocorreu uma perda inicial acentuada da percentagem de CFT dos extratos em estudo. Este facto está em desacordo com o descrito para outras matrizes de pequenos frutos, onde relatam que numa fase inicial do processo ocorre um ligeiro aumento do teor em CFT (Chia-Jung *et al.*, 2013; Tagliazucchi *et al.* 2010). No entanto a degradação dos polissacarídeos (açúcares) e de triglicérideos promovidos pela enzima α -amilase poderá estar na origem nesta perda inicial, pois alguns destes compostos possuem ligações glicosídeas (Bouayed *et al.*, 2012).

Neste estudo observou-se que não se verificaram apenas perdas na boca e sim ao longo das restantes fases do trato gastrointestinal (boca-estômago; estômago-intestino delgado). Desta forma, a diminuição do teor de CFT parece ser aceitável quando esta ocorre da transição do ambiente ácido, do estômago, para o ambiente alcalino, do intestino delgado, devido às diferenças do pH do meio (Tagliazucchi *et al.*, 2010).

Com base em outros estudos foi demonstrado que o método da simulação “*in vitro*” diminuiu o conteúdo fenólico em pelo menos 47% em sumos de fruta digeridos quando comparados com os não digeridos. Também num estudo similar em uvas, após digestão gastrointestinal, verificou-se que

apenas 62% dos flavonóides conseguiram ficar bioacessíveis para a absorção (Bouayed *et al.*, 2011). A transição do ambiente ácido, do estômago, para o ambiente alcalino, do intestino delgado, pode estar na origem desta diminuição, especialmente devido às antocianinas (Bouayed *et al.*, 2011). No entanto segundo os estudos de León-González *et al.*, (2012 e 2013), as camarinhas são pouco ricas em antocianinas e muito ricas em ácidos hidrodinâmicos que, segundo o mesmo autor, possuem uma ampla absorção no intestino delgado. Nesta avaliação, o uso de solventes químicos durante as extrações pode ter influenciado na bioacessibilidade dos CFT. No entanto, existem outros fatores que poderão estar na origem da diminuição do teor em compostos fenólicos, tais como, a estrutura destes compostos, o tratamento da amostra, o pH, a atividade enzimática, o tempo de digestão e a temperatura (Bouayed *et al.*, 2011).

Relativamente aos métodos de extração em estudo, a Tabela 8 demonstra a percentagem de perda do teor de compostos fenólicos totais por cada tipo de extração (EtAg, AcAg e Me) ao longo desta avaliação.

Tabela 8: Percentagem de perda dos compostos fenólicos por tipo de extração (EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCT - grainha de camarinha branca).

Amostra		Tipo de extração (média±desvio padrão)		
		EtAg	AcAg	Me
Polpas	PCB	80±1	79±1	87±1
	PCT	80±1	83±1	80±1
Grainhas	GCB	64±4	74±3	73±3
	GCT	66±2	78±3	67±4

Comparando os diferentes extratos das polpas, no que respeita ao efeito global (Tabela 8) verificou-se que o extrato AcAg com amostra PCB foi o que deteve de uma ligeira menor perda na percentagem de composto fenólicos (79%) inicialmente presentes. Em todos os restantes extratos a percentagem de perda destes compostos foi maior, variando de 80-87% do total inicial.

Relativamente aos diferentes extratos das grainhas, no que respeita ao efeito global (Tabela 8) verificou-se que o extrato EtAg com amostra GCB foi o

que obteve uma ligeira menor perda na percentagem de composto fenólicos (64%) inicialmente presentes. Em todos os restantes extratos, a percentagem de perda de compostos fenólicos que fica disponível foi maior, variando de 67-78% do total inicial. Assim, os extrato AcAg e EtAg das polpas e das grainhas, respetivamente apresentaram-se como sendo os mais estáveis na preservação dos compostos fenólicos ao longo do aparelho digestivo.

3.4.2. Atividade antioxidante por ABTS

O comportamento da atividade antioxidante por ABTS, ao longo das diferentes etapas do trato gastrointestinal, expresso em percentagem, encontra-se representado na Tabela 9. De acordo com os resultados obtidos verificou-se que em todos extratos analisados ocorreu um decréscimo da percentagem da atividade antioxidante ao longo de todas as etapas. O decréscimo mais acentuado foi verificado na passagem pela boca, à semelhança do anterior observado no teor de compostos fenólicos totais (com perdas entre 31% e 55%). A transição do estômago-intestino é aquela que, aparentemente originou uma menor perda (perdas entre 3% e 27%).

Tabela 9: Percentagem da atividade antioxidante, por ABTS disponível em cada etapa do trato gastrointestinal (EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCB - grainha de camarinha branca).

Amostra		Etapas	Tipo de extração (média±desvio padrão)		
			EtAg	AcAg	Me
Polpas	PCB	Início	100±0	100±0	100±0
		Boca	57±1	69±1	67±2
		Estômago	43±2	28±2	35±1
		Intestino	27±1	21±2	22±1
	PCT	Início	100±0	100±0	100±0
		Boca	57±0	80±16	41±1
		Estômago	42±3	38±7	46±1
		Intestino	20±2	32±6	36±1
Grainhas	GCB	Início	100±0	100±0	100±0
		Boca	45±1	66±2	73±0
		Estômago	39±1	46±1	52±0
		Intestino	18±1	28±1	49±0
	GCT	Início	100±0	100±0	100±0
		Boca	58±0	67±1	73±0
		Estômago	49±0	43±0	51±0
		Intestino	22±1	24±1	48±0

No que diz respeito aos diferentes extratos das polpas de camarinhas brancas e translúcidas foi possível observar que a atividade antioxidante na etapa boca variou entre 57-69% e 57-80%, no estômago 28-43% e 38-42% e no intestino delgado 21-27% e 20-36%, respetivamente (Tabela 9).

Relativamente aos diferentes extratos das grainhas de camarinhas brancas e translúcidas foi possível averiguar que a atividade antioxidante na etapa boca variou entre 45-73% e 58-73%, no estômago 39-52% e 43-51% e no intestino delgado 18-49% e 22-48%, respetivamente (Tabela 9).

Neste estudo verificou-se que ocorreu uma ligeira tendência para uma maior perda da atividade antioxidante, nas amostras de polpas em comparação com as de grainhas (Tabela 9). Desta forma, poderá indicar que a atividade antioxidante da componente fenólica, maioritariamente presente nas grainhas diferencia-se ligeiramente da das polpas e que estas possuem uma maior estabilidade às condições das diferentes etapas do trato gastrointestinal

Nesta simulação “*in vitro*”, a atividade antioxidante tanto nas amostras de polpa como nas de grainha, quando foi adicionada a α -amilase (simulação na boca) ocorreu uma perda da atividade antioxidante. Este resultado não vai ao encontro de alguns estudos similares, realizados noutras matrizes de pequenos frutos, no qual relatam que numa fase inicial e ao longo do processo digestivo ocorre um aumento da atividade antioxidante de certos compostos, promovendo desta forma a proteção do sistema gastrointestinal contra diversas doenças provocadas pelas espécies reativas de oxigénio (ROS) (Chia-Jung *et al.*, 2013). Por outro lado, uma maior quantidade de compostos antioxidantes, não significa que ocorra uma maior bioacessibilidade destes (Stanisavljević *et al.*, 2015). No entanto, segundo Bouayed *et al.*, (2011) a atividade antioxidante dos compostos digeridos sofre um aumento durante a transição do meio ácido gástrico do estômago, para o meio alcalino intestinal, sugerindo que o meio intestinal possa facilitar a libertação dos compostos ligados à matriz dos alimentos (Tagliazucchi *et al.*, 2010; Bouayed *et al.*, 2011).

Nesta avaliação, o uso de solventes químicos durante as extrações pode ter alguma influência na bioacessibilidade da componente fenólica e consequentemente na atividade antioxidante da mesma. No entanto, existem outros fatores que poderão estar na origem da diminuição da atividade

antioxidante, tais como, a interação com outros nutrientes da matriz alimentar, o tratamento da amostra, o pH, a atividade enzimática, o tempo de digestão e a temperatura (Bouayed *et al.*, 2011).

No que diz respeito aos métodos de extração, a Tabela 10 apresenta a percentagem da perda da atividade antioxidante por cada tipo de extração (EtAg, AcAg e Me) ao longo desta simulação “*in vitro*”.

Tabela 10: Percentagem de perda da atividade antioxidante por tipo de extração (EtAg - etanol:água; AcAg - acetona:água; Me – metanol; PCB - polpa de camarinha branca; PCT - polpa de camarinha translúcida; GCB - grainha de camarinha branca e GCT - grainha de camarinha branca).

Amostra		Tipo de extração (média±desvio padrão)		
		EtAg	AcAg	Me
Polpas	PCB	73±1	79±2	78±1
	PCT	80±2	68±6	64±1
Grainhas	GCB	82±1	72±1	51±0
	GCT	78±1	76±1	52±0

Relativamente aos diferentes extratos das polpas, no que respeita ao efeito global (Tabela 10) averiguou-se que os resultados obtidos apresentaram-se muito semelhantes entre si. No entanto o extrato metanol com amostra PCT foi o que deteve uma ligeira menor perda da atividade antioxidante no final (64%) relativamente ao total inicial. Em todos os restantes extratos a percentagem de perda da atividade antioxidante foi maior, variando de 68-80% do total inicial.

Relativamente aos diferentes extratos das grainhas, no que respeita ao efeito global (Tabela 10) verificou-se que os extratos de metanol com as amostras GCB e GCT foram os que detiveram uma ligeira menor perda da percentagem da atividade antioxidante, com os valores de 51% e 52%, respetivamente. Em todos os restantes extratos, a percentagem de perda da atividade antioxidante foi maior, variando de 72-82% do total inicial. Assim, os extratos de metanol das polpas e das grainhas apresentaram-se como sendo os mais estáveis na preservação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos ao longo do aparelho digestivo.

CAPITULO IV: CONCLUSÕES

Este estudo teve como finalidade determinar as propriedades físico-químicas das camarinhas, bem como determinar os compostos bioativos e a bioacessibilidade dos diferentes extratos das amostras de polpas e de grainhas. Perante os resultados obtidos foram realizadas comparações entre os diferentes extratos e determinada a bioacessibilidade “*in vitro*” dos compostos fenólicos e da sua atividade antioxidante ao longo das diferentes etapas do trato gastrointestinal.

Nas análises físicas foi possível concluir que as camarinhas em estudo possuem uma altura média de 8,6 mm, um diâmetro médio de 9,4 mm e uma massa média de 0,7 g. Relativamente à caracterização da cor, as camarinhas apresentavam uma cor clara ($L^*=79,8$) e tonalidade amarelada ($h^0=77,3$). Quanto à textura concluiu-se que estes pequenos frutos, têm alguma elasticidade (2,9 mm) e uma baixa dureza (1,9 N).

A caracterização química mostrou que as camarinhas eram compostas, maioritariamente, por água (87,9%), por açúcares totais (83,6% ms) e por fibras (36,5% ms). Continham também, 2,8 mg ácido ascórbico/100 g, uma acidez de 1,4 g expressa em ácido tartárico por 100 g, um teor em sólidos solúveis totais de 6,3 °Brix e um o índice de maturação de 4,5.

Relativamente aos diferentes métodos de extração foi possível concluir que a solução de acetona:água foi a que se mostrou mais eficiente na extração dos diferentes compostos bioativos em estudo.

No que diz respeito às quantidades dos diferentes compostos bioativos foi possível constatar que os extratos com a amostra de polpa de camarinha branca, de forma geral, destacam-se por serem ligeiramente mais ricos.

O teor em compostos fenólicos totais analisado nas polpas (1288,0 a 1614,1 mg EAG/100 g) e nas grainhas (462,9 a 1280,6 mg EAG/100 g) mostra que estes pequenos frutos podem ter um potencial atrativo e promissor para o aproveitamento tecnológico. Por outro lado, os valores da atividade antioxidante nas polpas variaram de 35,7 a 42,0 $\mu\text{mol TE/g}$ pelo método DPPH e de 65,7 a 84,4 $\mu\text{mol TE/g}$ pelo método ABTS. Nas grainhas variaram de 25,0 a 36,0 $\mu\text{mol TE/g}$ pelo método DPPH e de 52,4 a 73,9 $\mu\text{mol TE/g}$ pelo método ABTS.

No que diz respeito à avaliação da correlação entre a atividade antioxidante e os diferentes compostos bioativos foi possível concluir que as propriedades antioxidantes dos extratos das polpas e das grainhas se devem, tendencialmente, à presença de compostos fenólicos, orto-difenóis, flavonóides e taninos.

No estudo à bioacessibilidade “*in vitro*” verificou-se que ficavam disponíveis para absorção no intestino delgado cerca de 13 a 20% do total de compostos fenólicos presentes nas polpas, preservando-se entre 21 a 36% da sua atividade antioxidante. Por outro lado, nas grainhas cerca de 22 a 36% do total de compostos fenólicos, preservando-se entre 18 a 49% da sua atividade antioxidante.

Com este estudo pode concluir-se que as camarinhas são pequenos frutos portadores de um grande potencial em diversos compostos bioativos, com elevados benefícios para a saúde dos consumidores.



**CAPITULO V: REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

- Álvarez-Cansino, Leonor, Mari Cruz Díaz Barradas, María Zunzunegui, Mari Paz Esquivias, e Todd E. Dawson (2012) «Gender-specific variation in physiology in the dioecious shrub *Corema album* throughout its distributional range». *Functional Plant Biology* 39 (12): 968–78.
- Álvarez-Cansino, Leonor, María Zunzunegui, Mari Cruz Díaz Barradas, e Mari Paz Esquivias (2010) «Gender-Specific Costs of Reproduction on Vegetative Growth and Physiological Performance in the Dioecious Shrub *Corema album*». *Annals of Botany*, Setembro, mcq197.
- Alvarez-Cansino, Leonor, María Zunzunegui, Mari Cruz Díaz Barradas, e Mari Paz Esquivias (2010) «Physiological Performance and Xylem Water Isotopic Composition Underlie Gender-Specific Responses in the Dioecious Shrub *Corema Album*». *Physiologia Plantarum* 140 (1): 32–45.
- Barros, Tânia Isabel Vargues. (2012) «O fruto de *Monstera deliciosa*: caracterização físico-química e potencial para produção de aguardente». Tese de Mestrado, UAlg-Universidade do Algarve.
- Bosso, Antonella, Massimo Guaita, e Maurizio Petrozziello (2016) «Influence of solvents on the composition of condensed tannins in grape pomace seed extracts». *Food Chemistry*. Acedido Março 28.
- Bouayed, Jaouad., Hoffmann, Lucien., Bohn, T., (2011). «Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake». *Food Chemistry*, 128, 14–21.
- Bouayed, Jaouad, Hannah Deußer, Lucien Hoffmann, e Torsten Bohn. (2012). «Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their native patterns». *Food Chemistry* 131 (4): 1466–72.
- Bras, Pedro, De Oliveira, e Adam Dale (2012) «*Corema album* (L .) D . Don , the white crowberry – a new crop» 2: 123–33. doi:10.3233/JBR-2012-033.
- Calviño-Cancela, María (2002) «Spatial Patterns of Seed Dispersal and Seedling Recruitment in *Corema Album* (Empetraceae): The Importance

- of Unspecialized Dispersers for Regeneration». *Journal of Ecology* 90 (5): 775–84.
- Calviño-Cancela, María (2004) «Ingestion and dispersal: direct and indirect effects of frugivores on seed viability and germination of *Corema album* (Empetraceae)». *Acta Oecologica* 26 (1): 55–64.
- Calviño-Cancela, María (2005) «Fruit consumers and seed dispersers of the rare shrub *Corema album*, Empetraceae in coastal sand dunes». *Revue d'Ecologie* 60 (2): 97–106.
- Charoenkiatkul, Somsri, Parunya Thiyajai, e Kunchit Judprasong (2016). «Nutrients and bioactive compounds in popular and indigenous durian (*Durio zibethinus murr.*)». *Food Chemistry*, 10th International Food Data Conference (IFDC): Joining nutrition, agriculture and food safety through food composition, 193 (Fevereiro): 181–86.
- Chia-Jung Chiang, Hoda Kadouh (2013). «Phenolic compounds and antioxidant properties of gooseberry as affected by in vitro digestion». *LWT - Food Science and Technology* 51 (2): 417–22.
- Clavijo, A., M. C. Diaz Barradas, M. Zunzunegui, F. Ain-Lhout, L. Alvarez Cansino, O. Correia, e F. Garcia Novo (2003) «A conservação de *Corema album* no litoral atlântico da península ibérica ; a influência de dispersores animais na regeneração natural.» *ResearchGate* 21 (Janeiro): 43–56.
- Costa, Catarina Antunes da. (2011) «Factores que condicionam a dispersão e o recrutamento da camarinha em sistemas dunares». Tese de Mestrado, Universidade de Lisboa - Faculdade de Ciência.
- Diana Macedo, Lucélia Tavares, Gordon J. McDougall, Derek Stewart, Ricardo B., e and Cláudia N. Santos Ferreira, Sandra Tenreiro, Tiago F. Outeiro. (2013) «Mechanistic insights into polyphenol-mediated protection against alpha-synuclein toxicity in yeast*». *JBC*.
- Du, Liqing, Yixiao Shen, Xiumei Zhang, Witoon Prinyawiwatkul, e Zhimin Xu. (2014) «Antioxidant-rich phytochemicals in miracle berry (*Synsepalum*

- dulcificum) and antioxidant activity of its extracts». *Food Chemistry* 153 (Junho): 279–84.
- Elanne Costa Glória. (2014) «Caracterização físico-química dos frutos de Mirindiba do Cerrado». Tese de Mestrado, UFT - Universidade Federal do Tocantis –.
- Ferreira, Ana Alexandra Martins Pina da Mota (2013) «Vegetação Adaptada à Proximidade do Mar no Litoral Norte Português - Proposta de Recuperação dos Espaços Exteriores do Hospital da Boa Nova» Tese de Mestrado, FCUP- Universidade do Porto.
- Ferreira, Cláudio José Morais (2015) «Caracterização físico-química de variedades de maçãs de Carrazeda de Ansiães». Tese de Mestrado, UTAD - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Figueiredo, Tânia Margarida Pereira (2012) «Validação de métodos analíticos: Determinação do teor de açúcar numa amostra de produto alimentar». Tese de Mestrado, Coimbra: Universidade de Coimbra.
- Fronk, Petra, Hermann Hartmann, Margarita Bauer, Even Solem, Elmar Jaenicke, Stefan Tenzer, e Heinz Decker (2015) «Polyphenoloxidase from Riesling and Dornfelder wine grapes (*Vitis vinifera*) is a tyrosinase». *Food Chemistry* 183 (Setembro): 49–57.
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., e Fernandez-Gutierrez, A. (2010).« Phenolic-Compound-Extraction systems for fruit and vegetable samples». *Molecules*. 15: 8813-8826.
- Garrido, Jorge, e Fernanda Borges (2013) «Wine and grape polyphenols — A chemical perspective». *Food Research International* 54 (2): 1844–58.
- Gil-López, Manuel Jesús (2011) «Etnobotánica de la camarina (*Corema album*, Empetraceae) en Cádiz». *Acta Botanica Malacitana* 36: 137–44.
- Gutián, Pablo, Mónica Medrano, e Mónica Rodríguez. (1997) «Reproductive biology of *Corema album* L.D. Don (Empetraceae) in the northwest Iberian Peninsula». *Acta Botanica Gallica* 144 (1): 119–28.

- Gutiérrez, T. M., Hoyos, O. L., Páez, M. I., (2007). «Determinación del contenido de ácido ascórbico em uchuva (*Physalis peruviana* L.), por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). *Facultade de Ciencias Agropecuarias* 5, 70-79.
- Hellmann, Christine, Rabea Sutter, Katherine G. Rascher, Cristina Máguas, Otilia Correia, e Christiane Werner (2011) «Impact of an exotic N₂-fixing *Acacia* on composition and N status of a native Mediterranean community». *Acta Oecologica* 37 (1): 43–50.
- Hipólito, Cátia Vanessa Gonçalves (2012) «Qualidade do fruto vs. qualidade do sorbet. Estudo do efeito do tempo e temperatura de conservação do sorbet». Tese de Mestrado, ISA/UTL- Instituto Superior de Agronomia - Universidade de Técnica de Lisboa.
- Jakobek, Lidija, Marijan Šeruga, Ivana Novak, e Martina Medvidović-Kosanović. 2007. «Flavonols, Phenolic Acids and Antioxidant Activity of Some Red Fruits». *Deutsche Lebensmittel-Rundschau: Zeitschrift für Lebensmittelkunde und Lebensmittelrecht* 103 (8): 1–10.
- Jeong, Chang-Ho, Chi-Woen Jang, Dong-Chan Kum, Koo Yul Lee, Seung Yuan Lee, Sun Jin Hur, e Seung-Jae Lee (2014) «Protective Effects of Berry Extracts on Hydrogen Peroxide-Induced Rat Brain Neuronal Cell Damage *in vitro* ». *Journal of Food and Nutrition Research, Journal of Food and Nutrition Research* 2 (6): 277–80.
- Jorjong, Sujitar, Luchai Butkhup, e Supachai Samappito. (2015). «Phytochemicals and antioxidant capacities of Mao-Luang (*Antidesma bunius* L.) cultivars from Northeastern Thailand». *Food Chemistry* 181 (Agosto): 248–55.
- Kylli, Petri. (2010). «Berry Phenolics: Isolation, Analysis, Identification, and Antioxidant Properties». Helsinki: University of Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Food and Environmental.
- Koirala, Niranjana, Nguyen Huy Thuan, Gopal Prasad Ghimire, Duong Van Thang, e Jae Kyung Sohng. (2016). «Methylation of flavonoids: Chemical

- structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production». *Enzyme and Microbial Technology* 86 (Maio): 103–16.
- Larrinaga, Asier R. (2009). «Rabbits (*Oryctolagus Cuniculus*) Select Small Seeds When Feeding on the Fruits of *Corema Album*». *Ecological Research* 25 (1): 245–49.
- León-González, Antonio J., Raquel Mateos, Sonia Ramos, M. Ángeles Martín, Beatriz Sarriá, Carmen Martín-Cordero, Miguel López-Lázaro, Laura Bravo, e Luis Goya (2012) «Chemo-protective activity and characterization of phenolic extracts from *Corema album*». *Food Research International* 49 (2): 728–38.
- León-González, Antonio J., Pilar Truchado, Francisco a. Tomás-Barberán, Miguel López-Lázaro, Mari Cruz Díaz Barradas, e Carmen Martín-Cordero (2013a) «Phenolic acids, flavonols and anthocyanins in *Corema album* L.D. Don berries». *Journal of Food Composition and Analysis* 29 (1): 58–63.
- Li, Jianhua, John Alexander, Tom Ward, Peter Del Tredici, e Rob Nicholson. (2002) «Phylogenetic Relationships of Empetraceae Inferred from Sequences of Chloroplast Gene matK and Nuclear Ribosomal DNA ITS Region». *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25 (2): 306–15.
- Marques, Elisabete Maria Matos de Sousa. 2007. «Caracterização das populações de camarinha (*Corema album* L.) no Cabo Carvoeiro». Tese de Mestrado, Universidade de Lisboa- Faculdade de Ciência.
- Mateos, R., Espartero, J. L., Trujillo, M., Ríos, J. J., León-Camacho, M., & Alcudia, F.(2001). «Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection». *Journal of Agriculture and Food Chemistry*,49(5), 2185–2192.
- Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O. G., (2005). «Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity» *Food chemistry* 91 571 – 577.

- McDougall, G. J., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., Stewart, D., (2005) «Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system». *Journal of agricultural and food chemistry* 53, 5896–5904.
- Nunes, Maria Antónia da Mota. (2012) «Determinação da capacidade antioxidante e parâmetros físico-químicos em smoothies: estabilidade ao longo do tempo de armazenamento». Tese de Mestrado, FCUP- Universidade do Porto.
- NP 785 (1985) – «Derivados de Frutos e de Produtos Hortícolas. Determinação do resíduo seco solúvel. Processo corrente». Lisboa: Instituto Português da Qualidade
- NP-1420 (1987): Frutos, Produtos Hortícolas e Seus Derivados. Determinação dos Açúcares Totais, dos Açúcares Redutores e dos Açúcares Não Redutores (Sacarose). Técnica de Luff-Schoorl. Processo Corrente», Lisboa: Instituto Português da Qualidade
- NP-1421: (1977) «Géneros Alimentícios Derivados de Frutos e de Produtos Hortícolas. Determinação da Acidez», Lisboa: Instituto Português da Qualidade.
- Oliveira, Pedro Brás de, e Adam Dale. (2012) «Corema album L.D.Don, the white crowberry - a new crop.» *Journal of Berry Research* 2 (3): 123–33.
- Oliveira, Mónica Ferreira (2014) «Avaliação da resposta anti-inflamatória de um extrato de *Vaccinium corymbosum* (mirtilo) num modelo de artrite reumatoide». Tese de Mestrado, Universidade de Lisboa- Faculdade de Farmácia.
- Pereira, Anaísa Sofia Gomes (2014) «Avaliação da bioacessibilidade de compostos antioxidantes em variedades de maçã produzidas em Portugal». Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa.
- Pimpão, Rui C, Tristan Dew, Pedro B Oliveira, Gary Williamson, Ricardo B Ferreira, e Claudia N Santos. (2013a). «Analysis of pHenolic compounds

- in Portuguese wild and commercial berries after multienzyme hydrolysis.» *Journal of agricultural and food chemistry* 61 (17): 4053–62.
- Pimpão, Rui C., Tristan Dew, Pedro B. Oliveira, Gary Williamson, Ricardo B. Ferreira, e Claudia N. Santos. (2013b) «Analysis of Phenolic Compounds in Portuguese Wild and Commercial Berries after Multienzyme Hydrolysis». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (17): 4053–6.
- Raquel Guiné, Fátima Carrilha, e Andreia Loureiro. 2010. «Influência do modo de secagem sobre a cor, a textura e a composição nutricional das pêras». Em *Secagem de Pêras da Tradição à Ciência*, 173–88. Capítulo 11. CI&DETS.
- Revista de Vinhos. 2015. «Geleia de Camarinha desperta interesse em todo o Mundo». <http://www.revistadevinhos.pt/artigos/show.aspx?seccao=noticias&artigo=18125>.
- Roussos, P. A., N-K. Denaxa, e T. Damvakaris (2009) «Strawberry fruit quality attributes after application of plant growth stimulating compounds». *Scientia Horticulturae* 119 (2): 138–46.
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. D., (2007). Metodologia Científica: «Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH.» Comunicado técnico ministério da agricultura, pecuária e abastecimento 127, 1-4.
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. M., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. D., (2007). Metodologia Científica: «Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS.» Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento comunicado técnico 128, 1-4
- Sánchez-Picó, Ángeles, Antonio J. León-González, Carmen Martín-Cordero, e Rafael R. Daga (2014) «Screening for natural anticancer agents using a fission yeast bioassay». *Phytochemistry Letters* 8 (Maio): 184–89.
- Sánchez-Salcedo, Eva M., Pedro Mena, Cristina García-Viguera, Francisca Hernández, e Juan José Martínez. (2015) «(Poly)phenolic compounds

- and antioxidant activity of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves: Their potential for new products rich in phytochemicals». *Journal of Functional Foods, Natural Antioxidants*, 18, Part B (Outubro): 1039–46.
- Santos, C., Tavares, V., Pontes, P., Alves, G.J., McDougall, D., Stewart, R. B. Ferreira (2009) «Portuguese crowsberry (*Corema album*), an interesting antioxidant white berry». *COST863 WG4 Joint Meeting with The 4th International Conference on Polyphenols and Health (ICPH2009)*.
- Santos, Joana Rosa. (2013) «Determinação do teor de fibra alimentar em produtos hortofrutícolas». Tese de Mestrado, ISA/UTL - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- Santos, Marta Sousa, Cristina Moniz de Oliveira, Teresa Valdivieso, e Pedro Brás de Oliveira (2014) «Effects of pretreatments on *Corema album* L.D. Don (subsp. *album*) seeds' germination». *Journal of Berry Research* 4 (4): 183–92.
- Semedo, Ana Catarina Jorge (2012) «Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*». Tese de Mestrado, Universidade de Lisboa- Faculdade de Farmácia.
- Soares, Susana, Nuno Mateus, e Victor de Freitas. (2012). «Interaction of different classes of salivary proteins with food tannins». *Food Research International* 49 (2): 807–13.
- Stanisavljević, Nemanja, Jelena Samardžić, Teodora Janković, Katarina Šavikin, Marija Mojsin, Vladanka Topalović, e Milena Stevanović (2015) «Antioxidant and Antiproliferative Activity of Chokeberry Juice Phenolics during in vitro Simulated Digestion in the Presence of Food Matrix». *Food Chemistry* 175 (Maio): 516–22.
- Tagliacucchi, Davide, Elena Verzelloni, Davide Bertolini, e Angela Conte (2010) «in vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols». *Food Chemistry* 120 (2): 599–606.

- Tecnoalimentar. 2015. «Geleia de Camarinha desperta interesse pelo mundo | TecnoAlimentar.pt». <http://www.tecnoalimentar.pt/noticias/geleia-de-camarinha-portuguesa-desperta-interesse-global/>
- Tiveron, Ana Paula (2008). «Atividade antioxidante e composição fenólica de verduras e legumes consumidos no Brasil» Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo (USP). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- Tsao, Rong. (2010). «Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols». *Nutrients* 2 (12): 1231–46.
- Waterhouse, A., (2009) «Folin–Ciocalteu micro method for total phenol in wine». Retrieved July 16, 2012.
- Wu, Pingping, Guangzhi Ma, Nianghui Li, Qian Deng, Yanyan Yin, e Ruqiang Huang. (2015) «Investigation of in vitro and in Vivo Antioxidant Activities of Flavonoids Rich Extract from the Berries of *Rhodomyrtus tomentosa*(Ait.) Hassk». *Food Chemistry* 173 (Abril): 194–202.
- Zuffo, Alan M., Fabrício R. Andrade, Zuffo Júnior, e Joacir M. (2014). «Caracterização biométrica de frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.) na região leste de Mato Grosso, Brasil». *Revista de Ciências Agrárias* 37 (4): 463–71.
- Zunzunegui, M., M. C. Díaz Barradas, A. Clavijo, L. Alvarez Cansino, F. Ain Lhout, e F. García Novo (2005) «Ecophysiology, Growth Timing and Reproductive Effort of Three Sexual Forms of *Corema Album* (Empetraceae)». *Plant Ecology* 183 (1): 35–46.