



Framboesa vermelha (*Rubus idaeus* L.): composição química e nutricional e propriedades bioativas

Ana Luísa Cepeda Vara

Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e ao Instituto Politécnico da Guarda para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde – Ramo Biotecnologia

Orientado por:

Doutora Lillian Barros

Doutor José Pinela

Professor Doutor António José Nogueira

Bragança, junho de 2020

Este trabalho de mestrado foi financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do Programa Operacional Regional Norte 2020, no âmbito do projeto *Mobilizador* Norte-01-0247-FEDER-024479: ValorNatural, e também pelo programa FEDER-Interreg España-Portugal através do projeto 0377_Iberphenol_6_E e TRANSCoLAB 0612_TRANS_CO_LAB_2_P. Um agradecimento à empresa “Ponto Agrícola Unipessoal, Lda”, de Tabuado, Marco de Canavezes, Portugal, que gentilmente forneceu as amostras de framboesa vermelha.



Agradecimentos

À Professora Doutora Isabel C.F.R. Ferreira, pela oportunidade de realizar este trabalho e por toda a simpatia e disponibilidade.

À minha orientadora Doutora Lillian Barros por toda a disponibilidade, ensinamentos e simpatia ao longo deste percurso, pois, apesar da sua vida preenchida, conseguiu sempre arranjar tempo para me ajudar e orientar.

Ao Doutor José Pinela, meu coorientador, deixo um agradecimento muito especial pois acompanhou-me desde o início até ao fim no decorrer deste trabalho. Por toda a experiência, profissionalismo e ensinamentos transmitidos. É um exemplo a seguir.

Ao Professor Doutor António José Nogueira, meu coorientador, por todo o apoio, amizade, incentivo e ensinamentos transmitidos.

A toda a equipa do Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada, em particular ao BioChemCore, e a todos aqueles que lá trabalham pela receção carinhosa e pela ajuda constante. Um especial agradecimento à Carla Pereira, Ângela Fernandes, Inês Dias e Andreia Tomas pelo apoio, dedicação e prontidão que sempre demonstraram.

Aos meus companheiros de laboratório Lívia, Camila, Samarone e Shirley, com vocês tudo foi mais fácil, divertido e com muitas peripécias. Os cientistas mais “top”. À minha amiga Renara, por toda a ajuda e por todas as palavras de carinho e incentivo.

Aos meus pais, pois sem eles esta caminhada não seria possível e à minha família por todo o incentivo e pela força que sempre me transmitiram.

Um muito obrigado!

Resumo

Nas últimas décadas tem-se verificado que diferentes biomoléculas presentes em frutos comestíveis apresentam uma série de atividades biológicas, nomeadamente propriedades anticancerígenas, antioxidantes, imunológicas, hipolipidémicas, anti-inflamatórias e hipoglicémicas. O género *Rubus* é um dos mais diversos no reino vegetal, abrangendo mais de 200 espécies que podem ser subdivididas em 12 subgéneros. Dentro deste género, a framboesa vermelha (*Rubus idaeus* L., família Rosaceae) é reconhecida pelo seu sabor característico e pela sua cor vermelha atrativa. Este pequeno fruto tem sido descrito como sendo uma fonte de compostos bioativos com propriedades benéficas para a saúde do consumidor, incluindo compostos fenólicos, tais como antocianinas e elagitaninos, e nutrientes como minerais, vitaminas, carotenoides e ácido ascórbico. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo contribuir para o aumento do conhecimento sobre o valor nutricional e composição química da framboesa vermelha, bem como avaliar diferentes propriedades bioativas de extratos obtidos a partir desta pseudobaga.

Para a caracterização nutricional e química da framboesa vermelha, as amostras foram liofilizadas e submetidas a vários métodos analíticos. A composição centesimal (teores de humidade, gordura, proteína, cinzas e hidratos de carbono e energia) foi avaliada seguindo métodos oficiais de análise de alimentos. Os perfis em açúcares livres, ácidos orgânicos e tocoferóis foram determinados em sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplados a detetores de índice de refração (RI), de díodos (DAD) e de fluorescência (FL), após procedimentos de extração adequados. Os ácidos gordos foram analisados num sistema de cromatografia gasosa acoplado a um detetor de ionização de chama (GC-FID), após extração por Soxhlet e derivatização. Os compostos fenólicos foram analisados em extratos hidroetanólicos num sistema de HPLC com detetor DAD acoplado a um espectrómetro de massa (HPLC-DAD-ESI/MSⁿ).

O extrato de framboesa foi submetido a vários bioensaios para avaliar a sua atividade biológica, nomeadamente: i) atividade antioxidante foi medida pela capacidade de inibir a formação espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), a hemólise oxidativa (OxHLIA) e a descoloração do β -caroteno (β -CBI); ii) a atividade antimicrobiana foi testada pelos métodos da microdiluição em placa e colorimétrico do cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT) contra diferentes estirpes de bactérias e fungos; iii) a atividade anti-inflamatória foi avaliada pela capacidade de inibir a produção de óxido nítrico (NO) em células RAW 264.7 estimuladas com lipopolissacarídeo; e iv) a atividade

citotóxica foi testada pelo ensaio da sulforrodamina B contra linhas celulares tumorais humanas, MCF-7 (carcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma de fígado), e uma cultura primária de células de fígado de porco (PLP2). Os resultados foram tratados e analisados estatisticamente.

Relativamente ao valor nutricional da framboesa vermelha, os hidratos de carbono foram os macronutrientes detetados em maior quantidade (16,12 g/100 g) a seguir à água (83,1 g/100 g), enquanto os teores de proteína e gordura foram $\leq 0,18$ g/100 g. Entre os compostos responsáveis pela doçura e acidez, foram detetados cinco açúcares livres, com predominância de frutose (2,42 g/100 g), e três ácidos orgânicos, principalmente ácido cítrico (2,7 g/100 g). Quanto a constituintes de natureza lipofílica, detetaram-se 21 ácidos gordos, com predominância dos ácidos: oleico (27.1%), palmítico (20.2%), α -linolénico (16.6%) e linoleico (11.9%). Os MUFA+PUFA representaram 58.3% da fração lipídica total (0,132 g/100 g) e a relação PUFA/SFA foi superior a 0,45. A framboesa apresentou também um teor interessante de tocoferóis (1920 μ g/100 g), com predominância de δ -tocoferol (1357 μ g/100 g).

A análise de HPLC-DAD-ESI/MSⁿ permitiu identificar dois ácidos fenólicos, nomeadamente ácido quínico e cafeoil-hexósido, e duas antocianinas, a cianidina-*O*-suforósido e a cianidina-*O*-hexósido. As antocianinas (4,51 mg/g) predominaram sobre os ácidos fenólicos (147 μ g/g) nos extratos de framboesa e poderão ser os compostos responsáveis pela cor vermelha da framboesa. Os ensaios de atividade antioxidante evidenciaram o potencial bioativo dos extratos *in vitro* no que concerne à sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica, a hemólise oxidativa e a descoloração do β -caroteno. O extrato também apresentou um efeito bactericida e fungicida contra as estirpes testadas, com alguns resultados comparáveis aos dos controlos positivos testados. Por outro lado, o extrato não mostrou citotoxicidade para as linhas celulares tumorais e não tumoral em estudo na concentração máxima testada (GI₅₀ >400 μ g/mL), nem atividade anti-inflamatória pela incapacidade de inibir a produção de NO pela linha celular RAW 264.7.

Este estudo demonstrou que a framboesa vermelha é equilibrada do ponto de vista nutricional e o seu consumo poderá trazer efeitos benéficas para a saúde do consumidor.

Palavras-chave: framboesa vermelha, composição nutricional, compostos fenólicos, antocianinas, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana.

Abstract

In the last decades it has been verified that different biomolecules present in edible fruits have a series of biological activities, namely anticancer, antioxidant, immunological, hypolipidemic, anti-inflammatory and hypoglycemic properties. The *Rubus* genus is one of the most diverse in the plant kingdom, covering more than 200 species that can be subdivided into 12 subgenera. Within this genus, the red raspberry (*Rubus idaeus* L., family Rosaceae) is recognized for its characteristic flavor and attractive red color. This small fruit has been described as a source of bioactive compounds with beneficial properties for the health of the consumer, including phenolic compounds, such as anthocyanins and ellagitannins, and nutrients such as minerals, vitamins, carotenoids and ascorbic acid. In this sense, this work aimed to contribute to increase knowledge about the nutritional value and chemical composition of red raspberries, as well as to evaluate different bioactive properties of extracts obtained from this pseudoberry.

For the nutritional and chemical characterization of the red raspberry, the samples were lyophilized and subjected to various analytical methods. The proximate composition (moisture, fat, protein, ash and carbohydrate and energy contents) was evaluated following official food analysis methods. The profiles in free sugars, organic acids and tocopherols were determined in high performance liquid chromatography (HPLC) systems coupled to refractive index (RI), diode (DAD) and fluorescence (FL) detectors, after extraction procedures appropriate. Fatty acids were analyzed in a gas chromatography system coupled to a flame ionization detector (GC-FID), after extraction by Soxhlet and derivatization. The phenolic compounds were analyzed in hydroethanolic extracts in an HPLC system with a DAD detector coupled to a mass spectrometer (HPLC-DAD-ESI/MSⁿ).

The raspberry extract was subjected to several bioassays to assess its biological activity, namely: i) antioxidant activity was measured by the ability to inhibit the formation of reactive species of thiobarbituric acid (TBARS), oxidative hemolysis (OxHLIA) and β discoloration -carotene (β -CBI); ii) antimicrobial activity was tested by the microdilution plate and colorimetric methods of p-iodonitrotetrazolium chloride (INT) against different strains of bacteria and fungi; iii) the anti-inflammatory activity was evaluated by the ability to inhibit the production of nitric oxide (NO) in RAW 264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide; and iv) cytotoxic activity was tested by the

sulforhododamine B assay against human tumor cell lines, MCF-7 (breast carcinoma), NCI-H460 (lung carcinoma), HeLa (cervical carcinoma) and HepG2 (liver carcinoma), and a primary culture of pig liver cells (PLP2). The results were treated and analyzed statistically.

Regarding the nutritional value of red raspberry, carbohydrates were the macronutrients detected in greater quantity (16.12 g/100 g) after water (83.1 g/100 g), while the levels of protein and fat were ≤ 0.18 g/100 g. Among the compounds responsible for sweetness and acidity, five free sugars were detected, with a predominance of fructose (2.42 g/100 g), and three organic acids, mainly citric acid (2.7 g/100 g). As for lipophilic constituents, 21 fatty acids were detected, with a predominance of acids: oleic (27.1%), palmitic (20.2%), α -linolenic (16.6%) and linoleic (11.9%). MUFA+PUFA represented 58.3% of the total lipid fraction (0.132 g/100 g) and the PUFA/SFA ratio was greater than 0.45. The raspberry also had an interesting content of tocopherols (1920 μ g/100 g), with a predominance of δ -tocopherol (1357 μ g/100 g).

The HPLC-DAD-ESI/MSⁿ analysis made it possible to identify two phenolic acids, namely quinic acid and caffeoyl hexoside, and two anthocyanins, cyanidin-O-sulforoside and cyanidin-O-hexoside. Anthocyanins (4.51 mg/g) predominated over phenolic acids (147 μ g/g) in raspberry extracts and may be the compounds responsible for the red color of the raspberry. The antioxidant activity tests showed the bioactive potential of extracts *in vitro* with regard to their ability to inhibit lipid peroxidation, oxidative hemolysis and β -carotene discoloration. The extract also had a bactericidal and fungicidal effect against the tested strains, with some results comparable to those of the tested positive controls. On the other hand, the extract did not show cytotoxicity to the tumor and non-tumor cell lines under study at the maximum concentration tested (GI₅₀ > 400 μ g/mL), nor anti-inflammatory activity due to the inability to inhibit NO production by the RAW 264.7 cell line.

This study has shown that red raspberry is nutritionally balanced and its consumption may have beneficial effects on the consumer's health.

Keywords: red raspberry, nutritional composition, phenolic compounds, anthocyanins, antioxidant activity, antimicrobial activity.

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract.....	ix
Índice de figuras	xiii
Índice de tabelas	xv
Abreviaturas.....	xvii
1. ENQUADRAMENTO.....	1
2. ESTADO DA ARTE	2
2.1. A framboesa como fonte de nutrientes e compostos bioativos.....	5
2.2. Caracterização botânica de <i>Rubus idaeus</i> L.	5
2.3. Propriedades nutricionais de <i>Rubus idaeus</i> L.	7
2.4. Compostos bioativos em <i>Rubus idaeus</i> L.	7
2.4.1. Vitaminas.....	8
2.4.2. Compostos fenólicos	8
2.5. Propriedades bioativas de <i>Rubus idaeus</i> L.	9
2.5.1. Atividade antioxidante.....	10
2.5.2. Atividade antimicrobiana	11
2.5.3. Atividade anti-proliferativa	12
2.5.4. Atividade anti-inflamatória.....	13
2.6. Absorção e metabolismo de compostos bioativos	14
2.7. Extração e detecção de moléculas bioativas.....	15
3. OBJETIVOS.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. Padrões e Reagentes.....	21
4.2. Preparação do material vegetal	21
4.3. Avaliação da composição nutricional	22
4.3.1. Composição centesimal e valor energético	22
4.3.2. Análise de açúcares livres.....	24
4.3.3. Análise de ácidos orgânicos	24

4.3.4.	Análise de ácidos gordos	25
4.3.5.	Análise de tocoferóis	26
4.4.	Avaliação da composição fenólica e bioatividades	27
4.4.1.	Preparação do extrato hidroetanólico	27
4.4.2.	Análise de compostos fenólicos antociânicos e não antociânicos	27
4.4.3.	Avaliação da atividade antioxidante	29
4.4.4.	Avaliação da atividade antimicrobiana	31
4.4.5.	Avaliação da atividade anti-inflamatória	33
4.4.6.	Avaliação da atividade citotóxica	34
4.5.	Análise estatística	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1.	Valor nutricional	39
5.2.	Composição em compostos individuais	40
5.2.1.	Açúcares e ácidos orgânicos	40
5.2.2.	Ácidos gordos e tocoferóis	43
5.2.3.	Compostos fenólicos não antociânicos e antociânicos	47
5.3.	Propriedades bioativas <i>in vitro</i>	50
5.3.1.	Atividade antioxidante	50
5.3.2.	Atividade antimicrobiana	53
5.3.3.	Atividade anti-inflamatória e citotóxica	54
6.	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	57
6.1.	Notas de conclusão	59
6.2.	Perspetivas futuras	60
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

Índice de figuras

- Figura 1** - Framboesa vermelha (*Rubus idaeus* L.); pormenor da parte aérea da planta e do fruto. Fonte: https://jb.utad.pt/especie/Rubus_idaeus 6
- Figura 2** - Placa de digestão (A), tubos com amostras digeridas (B) e equipamento de destilação e titulação automática (C) para determinação dos teores de proteína. . 22
- Figura 3** - Aparelho de Soxhlet usado na extração de gordura (A) e mufla usada na determinação do teor de cinzas (B). 23
- Figura 4** - Equipamentos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usados na análise de açúcares livres e tocoferóis (A) e de ácidos orgânicos (B). 25
- Figura 5** - Equipamento de cromatografia líquida acoplado a um espectrómetro de massa (HPLC-DAD-ESI/MSⁿ) onde foi realizada a análise do perfil fenólico da framboesa vermelha. 28
- Figura 6** - Tubo de Falcon ilustrando o isolamento dos eritrócitos a partir de sangue de ovelha (A) e placa de 48 poços com a mistura a ser incubada a 37 °C (A). 30
- Figura 7** - Perfil em açúcares da amostra de framboesa vermelha. 1: frutose; 2: glucose; 3: sacarose; 4: trealose; 5: melezitose (padrão interno); e 6: rafinose. 41
- Figura 8** - Estrutura química dos ácidos orgânicos identificados na framboesa vermelha. Ácido ascórbico (A), ácido cítrico (B) e ácido fumárico (C). 42
- Figura 9** - Estrutura química dos ácidos gordos mais abundantes detetados na framboesa vermelha. Ácido oleico (A), ácido palmítico (B), ácido α -linolénico (C) e ácido linoleico (D). 44
- Figura 10** - Perfil em tocoferóis da amostra de framboesa vermelha. 1: α -tocoferol; 2: γ -tocoferol; 3: δ - tocoferol; e 4: tocol (padrão interno). 46
- Figura 11** - Estrutura química do α -tocoferol (A), do γ -tocoferol (B) e do δ -tocoferol (C). 46

- Figura 12** - Perfil em antocianinas do extrato purificado de framboesa vermelha, registado a 520 nm. 1: cianidina-*O*-soporósido e 2: cianidina-*O*-hexósido. 47
- Figura 13** - Estrutura química do ácido quínico (A) e da cianidina-*O*-suforósido (B).. 49
- Figura 14** - Estrutura química do complexo MDA-TBA2 formado entre o malondialdeído (MDA) e o ácido tiobarbitúrico (TBA) e tubos de ensaio evidenciando a cor rosa do complexo formado. 51
- Figura 15** - Curvas de hemólise das diferentes concentrações de extrato de framboesa vermelha e do PBS usado como controlo. 52

Índice de tabelas

Tabela 1 - Subdivisão do género <i>Rubus</i> em 12 subgéneros.....	6
Tabela 2 - Perfil nutricional da framboesa vermelha.....	7
Tabela 3 - Composição centesimal e valor energético da framboesa vermelha.	39
Tabela 4 - Composição em açúcares e ácidos orgânicos da framboesa vermelha.....	41
Tabela 5 - Composição em ácidos gordos da framboesa vermelha.....	43
Tabela 6 - Composição de tocoferóis da framboesa vermelha.	46
Tabela 7 - Identificação e quantificação de compostos fenólicos no extrato purificado de framboesa vermelha. É apresentado o tempo de retenção (Tr), o comprimento de onda de absorção máxima na região UV-vis (λ_{max}), o íão pseudomolecular e os fragmentos MS ² (abundância relativa entre parêntesis).....	48
Tabela 8 - Atividade antioxidante do extrato de framboesa e dos controlos positivos. 50	
Tabela 9 - Atividade antibacteriana e antifúngica do extrato de framboesa e controlos positivos.	53
Tabela 10 - Atividade anti-inflamatória e citotóxica do extrato de framboesa vermelha e controlos positivos.	54

Abreviaturas

AAPH	2,2'-azobis(2-metilpropionamida)di-hidroclorido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AOAC	Associação de Químicos Analistas Oficiais (<i>Association of Official Analytical Chemists</i>)
BHT	Butil-hidroxitolueno (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol)
CAT	Catalase
CMB	Concentração mínima bactericida
CMF	Concentração mínima fungicida
CMI	Concentração mínima inibitória
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DAD	Detetor de díodos
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC₅₀	Concentração de extrato responsável por 50% de atividade antioxidante
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
EUA	Estados Unidos da América
FAME	Ésteres metílicos de ácidos gordos (<i>fatty acid methyl esters</i>)
FID	Detetor de ionização de chama (<i>flame ionization detector</i>)
GC	Cromatografia gasosa (<i>gas chromatography</i>)
GR	Glutaciona redutase
GSH-Px	Glutaciona peroxidase
GST	Glutaciona-S-transferase
HBSS	Solução salina equilibrada de Hank
HeLa	Linha celular humana de carcinoma cervical
HepG2	Linha celular humana de carcinoma hepatocelular
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
HPLC-FL	Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fluorescência
HPLC-RI	Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de índice de refração
IC₅₀	Concentração responsável por 50% de atividade

ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
INT	Cloreto de <i>p</i> -iodonitrotetrazólio
LPS	Lipopolissacarídeo
MCF-7	Linha celular humana de adenocarcinoma de mama
MeOH	Metanol
MHB	Mueller-Hinton agar
MMP-2	Metaloproteinases-2 da matriz
MS	Espectrometria de massa (<i>mass spectrometry</i>)
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados (<i>monounsaturated fatty acids</i>)
NCI-H460	Linha celular humana de cancro de pulmão
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
OxHLIA	Ensaio de inibição da hemólise oxidativa (<i>oxidative haemolysis inhibition assay</i>)
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PGE2	Prostaglandina E2
PLP2	Cultura primária de células de fígado de porco
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados (<i>polyunsaturated fatty acids</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigénio (<i>reactive oxygen species</i>)
SFA	Ácidos gordos saturados (<i>saturated fatty acids</i>)
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
SRB	Sulforrodamina B
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (<i>thiobarbituric acid reactive substances</i>)
TCA	Ácido tricloroacético
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TSB	Caldo soja tripticaseína (<i>trypticase soy broth</i>)
UV-Vis	Radiação ultravioleta-visível
β-CBI	Inibição da descoloração do β-caroteno

1. ENQUADRAMENTO

Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e ao Instituto Politécnico da Guarda, no âmbito da unidade curricular Projeto/Estágio/Dissertação, correspondendo ao segundo ano do mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde – Ramo Biotecnologia.

A importância de fazer este estudo assenta na contribuição que este terá para o aumento do conhecimento científico sobre o valor nutricional e a composição química da framboesa vermelha (*Rubus idaeus L.*), bem como sobre as propriedades bioativas de extratos obtidos a partir da mesma. Os resultados terão um elevado interesse para a comunidade científica, mas também para a sociedade em geral, principalmente para o consumidor que cada vez mais procura e consome este tipo de alimentos saudáveis, e para os produtores e comerciantes deste pequeno fruto vermelho.

Este estudo foi efetuado em colaboração com a empresa “Ponto Agrícola Unipessoal, Lda” de Tabuado, Marco de Canavezes, Portugal, que gentilmente forneceu as amostras de framboesa vermelha, o que possibilitou a presente investigação científica. O conhecimento gerado será posteriormente transferido para o setor empresarial e, conseqüentemente, para o consumidor final.



2. ESTADO DA ARTE

2.1. A framboesa como fonte de nutrientes e compostos bioativos

A framboesa vermelha (*Rubus idaeus L.*) é constituída por macronutrientes, como proteínas e lípidos (ácido linoleico e linolénico), mas também água, ácidos orgânicos, vitaminas (vitamina C, α -tocoferol e tocotrienol) e minerais (incluindo cálcio, potássio e magnésio) (“Detalhe Alimento,” 2010). É considerada um alimento nutritivo, contendo também fibra dietética, compostos fenólicos e carotenoides, apresentando efeitos benéficos para a saúde do consumidor (Lee, Dossett, & Finn, 2012). A framboesa vermelha é macia e suculenta, apresenta um aroma distinto e é fonte de antioxidantes naturais (Gülçin et al., 2011). Este fruto possui elevados níveis de açúcares e ácidos orgânicos, compostos que determinam a sua doçura e acidez (Kafkas, Koşar, Türemiş, & Başer, 2006). Como o sabor desta fruta depende de vários fatores como o teor em açúcar e o teor em ácidos orgânicos, mas também do tipo de compostos individuais e da sua quantidade, isto faz com que possam existir alterações na sua qualidade (Milivojević et al., 2011).

Segundo a “Food and Agriculture Organization of the United Nations”, a produção de framboesa em todo o mundo, no ano de 2018, foi de 870209 t, enquanto que em Portugal, no mesmo ano, a produção foi de 18229 t (FAOSTAT, 2020).

2.2. Caracterização botânica de *Rubus idaeus L.*

A framboesa vermelha pertence à família Rosaceae, género *Rubus* e subgénero *Idaeobatus*. Este subgénero engloba cerca de 200 espécies, que se distinguem pela facilidade com que os seus frutos maduros se separam do recetáculo. Muitas destas espécies têm sido alvo de melhoramento genético e agronómico, mas apenas as framboesas vermelha e preta são produzidas em larga escala. A espécie mais comum no continente Europeu é *Rubus idaeus L.* (framboesa vermelha). Esta é um fruto múltiplo de drupas (drupéolas) estreitamente unidas à volta do recetáculo, tal como mostrado na **Figura 1**, e apresenta em geral forma cónica arredondada, sendo cada drupéola, constituída por uma semente dura envolvida por polpa (Sousa, 2007).

As diferenças nos hábitos de frutificação das espécies do género *Rubus* têm sido utilizadas pelos sistematistas para delimitar subgéneros. Atualmente, considera-se a existência dos doze subgéneros apresentados na **Tabela 1** (Oliveira, 2007).



Figura 1 - Framboesa vermelha (*Rubus idaeus* L.); pormenor da parte aérea da planta e do fruto.
Fonte: https://jb.utad.pt/especie/Rubus_idaeus

Tabela 1 - Subdivisão do género *Rubus* em 12 subgéneros.

Subgénero	Nº de espécies	Interesse	Exemplo
<i>Chamaemorus</i>	1	Frutos colhidos na Natureza	<i>R. chamaemorus</i> L.
<i>Dalibarda</i>	5	Baixo	
<i>Chamaebatus</i>	5	Baixo	
<i>Comaropsis</i>	2	Baixo	
<i>Cylactis</i>	14	Melhoramento	<i>R. articus</i> L.
<i>Orobatus</i>	19	Baixo	
<i>Dalibardastrum</i>	4	Baixo	
<i>Malacholatus</i>	114	Ornamental	
<i>Anoplobatus</i>	6	Ornamental	
<i>Idaeobatus</i>	200	Muito alto - Framboesas	<i>R. idaeus</i> L.
<i>Lampobatus</i>	10	Baixo	
<i>Eubatus</i>	> 5 000	Muito alto - Amoras	<i>R. fruticosus</i> L. e <i>R. caesius</i> L.

Fonte: Adaptado de Oliveira (2007).

O subgénero *Idaeobatus*, onde estão incluídas as framboesas, encontra-se disseminado pelos cinco continentes, mas com uma distribuição centrada principalmente no hemisfério Norte, com especial incidência na Ásia, Europa e América do Norte (Oliveira, 2007).

2.3. Propriedades nutricionais de *Rubus idaeus* L.

Os frutos e os vegetais são fontes alimentares primárias que fornecem nutrientes essenciais para o ser humano; estes contêm uma ampla variedade de fitoquímicos, como compostos fenólicos, licopeno, antocianinas, entre outros, que fornecem importantes benefícios para a saúde do consumidor (Tosun, Ercisli, Karlidag, & Sengul, 2009).

Atualmente, há um interesse crescente nas framboesas como uma importante fonte de antioxidantes, nomeadamente antocianinas, catequina, flavonóis, flavonas e ácido ascórbico, pois podem oferecer proteção contra uma ampla variedade de doenças que afetam o ser humano (Gülçin et al., 2011). Do ponto de vista nutricional (Tabela 2), a framboesa apresenta grande interesse, pelo seu teor de sais minerais, vitamina C, provitamina A, vitaminas B1, B2 e B6, e pela presença de antioxidantes (Sousa, 2007).

Tabela 2 - Perfil nutricional da framboesa vermelha.

Nutrientes	Sais Minerais		Vitaminas		
<i>Quantidade em 100 g</i>					
Humidade	85,57 g	Cálcio	22 mg	Ácido ascórbico	25 mg
Valor energético	49 kcal	Ferro	0,57 mg	Tiamina	0,030 mg
Proteínas	0,91 g	Magnésio	22 mg	Riboflavina	0,09 mg
Gordura	0,55 g	Fósforo	12 mg	Niacina	0,90 mg
Hidratos de carbono	11,57 g	Potássio	152 mg	Ácido pantonénico	0,4 mg
Fibra alimentar	3,00 g	Sódio	0	Vitamina B6	13 mg
Cinzas	0,4 mg	Zinco	0,46 mg	Vitamina A	13 mg
		Cobre	0,074 mg		
		Manganês	1,013 mg		

Fonte: Adaptado de Sousa (2007). UI: unidades internacionais.

2.4. Compostos bioativos em *Rubus idaeus* L.

A framboesa vermelha é rica em compostos fenólicos, como ácidos fenólicos, taninos, estilbenos e flavonóides (incluindo antocianinas). Nos últimos anos, estes compostos bioativos têm sido associados a vários benefícios para a saúde, como prevenção de distúrbios inflamatórios, doenças cardiovasculares ou efeitos protetores para diminuir o risco de vários tipos de cancro. A sua presença na maioria dos alimentos vegetais, que fazem parte da nossa dieta diária, tornam os compostos fenólicos moléculas

muito interessantes do ponto de vista nutricional (Skrovankova, Sumczynski, Mlcek, Jurikova, & Sochor, 2015; Szymanowska, Baraniak, & Bogucka-Kocka, 2018).

A preferência do consumidor por alimentos não processados deve-se essencialmente ao facto de estes apresentarem uma composição elevada em compostos bioativos, que envolvem vários compostos biodisponíveis que estão associados a um contributo positivo na saúde do ser humano, contrariando os alimentos refinados/processados. Tem-se verificado um crescente interesse em espécies comestíveis selvagens, pois estas têm revelado uma fonte de compostos promotores de saúde, sendo uma boa opção para diversificar e enriquecer a dieta diária, contribuindo assim, para combater vários distúrbios de saúde (da Silva et al., 2019).

2.4.1. Vitaminas

Segundo o Instituto Nacional de Saúde (“Detalhe Alimento,” 2010), as vitaminas presentes na framboesa incluem vitamina A, vitamina D, α -tocoferol (vitamina E), tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6, vitamina B12, vitamina C (ácido ascórbico) e folatos (vitamina B9). Vários estudos revelam a importância de muitas destas vitaminas como poderosos antioxidantes promotores de saúde (De Ancos, Gonzalez, & Cano, 2000).

2.4.2. Compostos fenólicos

Os metabolitos secundários das plantas, principalmente compostos fenólicos, são caracterizados por uma forte atividade biológica. Existem quatro classes principais de polifenóis: flavonoides, ácidos fenólicos, lignanas e taninos, presentes em frutos e vegetais, que estão ligados a benefícios nutricionais e de saúde específicos (Rao & Snyder, 2010). Os compostos fenólicos possuem capacidade de eliminação de espécies reativas de oxigénio (ROS), exibindo atividade antioxidante (Trivedi, Verma, & Tyagi, 2016; Veljkovic et al., 2018).

A atividade biológica de vários frutos de bagas, incluindo framboesas, é também atribuída ao elevado teor de antocianinas (por exemplo, cianidina-3-glucosídeo, cianidina-3-rutinosídeo e pelargonidina-3-glucosídeo), flavonóis (quercetina e kaempferol), taninos e ácidos fenólicos (ácido elágico) (Seeram et al., 2006; Veljkovic et al., 2018).

Flavonoides e ácidos fenólicos são os compostos fenólicos mais comuns em frutas pequenas com forte capacidade antioxidante, estes constituem cerca de um terço dos fenóis da dieta. O seu conteúdo varia dependendo de alguns fatores, tais como espécies e cultivares, mas também pode ser afetado pelas condições de crescimento, incluindo fatores ambientais e técnicas de cultivo (Milivojević et al., 2011).

Os flavonoides ganharam interesse farmacológico devido à sua capacidade de quelar catalisadores metálicos, ativar enzimas antioxidantes, reduzir os radicais α -tocoferol e inibir as oxidases. Estes compostos podem interferir não apenas nas reações de propagação de radicais livres, mas também na formação de radicais, seja por quelação do metal de transição ou pela inibição das enzimas envolvidas na reação de iniciação (Zengin et al., 2018).

Num estudo de Noratto, Chew, & Atienza (2017) foram identificados aproximadamente 50 compostos fenólicos em cultivares de *Rubus idaeus*.

2.5. Propriedades bioativas de *Rubus idaeus* L.

Os frutos de baga são conhecidos pelas suas altas concentrações de compostos bioativos e propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, vasodilatadoras, anti-proliferativas e anticancerígenas. São considerados como uma classe superior de alimentos saudáveis (Bobinaitė, Viškelis, & Venskutonis, 2012; Četojević-Simin et al., 2015).

Nas últimas décadas, a capacidade antioxidante das frutas e vegetais tem sido um parâmetro elegível de qualidade, sendo que esta está diretamente relacionada com a presença de captadores de radicais livres de oxigénio como a Vitamina C e compostos fenólicos, que demonstram desempenhar um importante papel no controlo de ROS e no combate contra células cancerígenas (Milivojević et al., 2011).

Kirakosyan (2018) publicou um estudo em que verificou que um em cada quatro adultos nos Estados Unidos da América (EUA) tem síndrome metabólica. Estes indivíduos estão em risco de desenvolvimento de diabetes e doenças cardíacas. Os dados da literatura sugerem que a ingestão regular de frutas selvagens comestíveis (framboesa, amora, morango entre outras) pode prevenir e tratar muitos fatores de risco associados à síndrome metabólica e as suas complicações cardiovasculares.

As framboesas vermelhas estão a ser cada vez mais procuradas devido ao seu interesse como um alimento funcional saudável, pois está descrito em vários estudos que

o seu consumo regular diminui o risco de desenvolver doenças crônicas (Kirakosyan et al., 2018).

2.5.1. Atividade antioxidante

Os compostos fenólicos agem como antioxidantes devido à sua capacidade de doar um eletrão ou um átomo de hidrogénio a um radical livre, o que permite a sua conversão numa molécula inofensiva (Skrovankova et al., 2015; Szymanowska et al., 2018). Estes compostos têm demonstrado propriedades antioxidantes promissoras, estando o seu potencial diretamente relacionado com o tipo de solvente utilizado na extração, mas também com a origem vegetal, condições de cultivo, tempo de colheita e condições de armazenamento deste produto (Martins, Barros, & Ferreira, 2016). Devido ao perfil fenólico variado e à alta concentração de vitamina C, a framboesa pertence a um grupo de frutos de alta capacidade antioxidante (Veljkovic et al., 2018).

A estrutura geral dos compostos fenólicos contém um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilo. A capacidade antioxidante destes compostos é baseada principalmente na capacidade do anel fenólico estabilizar e deslocalizar eletrões não emparelhados. Além disso, estes compostos podem eliminar a produção de radicais livres, aumentar a capacidade antioxidante endógena das células e influenciar as vias de sinalização da interação com enzimas e recetores celulares (Schulz & Chim, 2019).

Os antioxidantes, tanto naturais como sintéticos, têm-se mostrado altamente eficazes no controlo da magnitude da produção de radicais livres, na prevenção dos seus efeitos indesejáveis, assim como no apoio aos mecanismos antioxidantes e desintoxicantes do organismo. Estes atuam em diferentes níveis na cadeia oxidativa envolvendo moléculas lipídicas (Martins et al., 2016). Além disso, a formação de produtos de oxidação secundária, medida pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), é aumentada após a peroxidação lipídica no tecido hepático, causando dano celular e rompimento da membrana celular quando os antioxidantes endógenos são eliminados (Zengin et al., 2018).

Wang, Cao e Prior (1996) descreveram que os antioxidantes exógenos podem ajudar a proteger o corpo humano contra danos causados por ROS. As ROS são produzidas e eliminadas naturalmente no organismo, no entanto, a sua produção excessiva leva ao stresse oxidativo, que é resultado do desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante corporal e a formação de radicais livres (Zengin et al., 2017).

Em situações em que há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade antioxidante, as biomoléculas são danificadas e ocorre o comprometimento do funcionamento celular, associado à progressão de doenças crônicas como cancro, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Schulz & Chim, 2019).

Os antioxidantes tornaram-se um grupo indispensável de aditivos alimentares, principalmente devido às suas propriedades únicas de prolongar o prazo de validade dos produtos alimentares, sem qualquer efeito adverso nas suas qualidades sensoriais ou nutricionais. Estes devem apresentar baixo custo, não serem tóxicos e serem eficazes em baixas concentrações; altamente estáveis e capazes de resistir ao processamento; não devem apresentar odor, gosto ou cor próprios; devem ser fáceis de incorporar e apresentar uma boa solubilidade na matriz alimentar (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

2.5.2. Atividade antimicrobiana

O termo antimicrobiano pode ser associado a uma ampla variedade de agentes farmacêuticos que incluem medicamentos antibacterianos, antifúngicos, antivirais e antiparasitários (Reis, Martins, Vasconcelos, Morales, & Ferreira, 2017). O tratamento de infecções bacterianas é extremamente importante; apesar da grande variedade de antibióticos existentes (aminoglicosídeos, β -lactâmicos, oxazolidinonas, lincosamidas e quinolonas), tratar infecções bacterianas tem-se tornado uma tarefa cada vez mais complicada, devido ao desenvolvimento de resistências bacterianas provocadas pelo uso inadequado de antibióticos.

A atividade antimicrobiana de compostos fenólicos de plantas tem sido intensamente estudada. Além de controlarem a invasão e o crescimento de agentes patogênicos nas plantas, a sua atividade contra agentes patogênicos humanos tem sido estudada para desenvolver novos ingredientes alimentares saudáveis, compostos medicinais e produtos farmacêuticos (Četojević-Simin et al., 2015; Liisa.J. et al., 2006).

O sumo e o licor de framboesa apresentaram capacidade de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium phlei*, *Clostridium perfringens*, *Alcaligenes faecalis*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella soneri* e três espécies de *Salmonella* (*Salmonella* sp., *E. coli*, *S. typhimurium*) (Četojević-Simin et al., 2015). Extratos de framboesa causaram a morte de *Helicobacter pylori* e apresentaram uma inibição muito forte contra *Bacillus cereus*, *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e forte contra *Campylobacter jejuni* e *C. perfringens*. A elevada atividade antibacteriana

tem sido atribuída aos compostos fenólicos, especialmente à fração dos elagitaninos (Četojević-Simin et al., 2015; Liisa.J. et al., 2006).

Neste sentido, os fitoquímicos em frutos de baga podem conferir atividades antimicrobianas, limitando potencialmente o desenvolvimento microbiano no hospedeiro (Vattem, Lin, Labbe, & Shetty, 2004). Além disso, produtores e consumidores estão cada vez mais conscientes do seu estado de saúde e do conhecimento sobre a ação dos antibióticos, como das bactérias resistentes aos antibióticos, aumentando o interesse por alimentos orgânicos e minimamente processados (Das, Islam, Marcone, Warriner, & Diarra, 2017; Vattem et al., 2004).

A contaminação microbiana é um dos principais desafios enfrentados pela indústria alimentar, pois esta pode resultar em perda da qualidade dos alimentos, e, conseqüentemente, perda de lucro econômico. Por estas razões, têm sido estudadas fontes naturais com potencial antimicrobiano, sendo que as framboesas e amoras de *Rubus* têm este potencial (Schulz & Chim, 2019).

2.5.3. Atividade anti-proliferativa

Em diversos estudos, foi destacado que frutos e vegetais atuam como uma barreira contra o cancro, marcando-os como “quimiopreventivos”, devido à presença de fitoquímicos bioativos. Estas moléculas compreendem pigmentos, como clorofila, carotenos, flavonoides e outros compostos fenólicos, vitaminas, fibras dietéticas, enzimas e minerais, entre outros constituintes minoritários. (Barreiro, Martins, González-Paramás, Ferreira, & Taofiq, 2016).

As framboesas mostraram propriedades anti-proliferativas em células humanas de cancro do fígado, mama, cólon e próstata (Bobinaitė et al., 2012; Četojević-Simin et al., 2015; Liisa.J. et al., 2006). O uso de componentes bioativos naturais pode servir como uma estratégia útil para prolongar ou bloquear o processo de carcinogênese. Por exemplo, frutos nativos australianos (ameixa, damasco, framboesa, maçã, entre outros) oferecem enormes oportunidades para a descoberta de fitoquímicos preventivos e/ou terapêuticos, em particular novos agentes anticancerígenos (Vuong et al., 2014).

O fígado está envolvido em diversas funções vitais relacionadas com a digestão, metabolismo, imunidade e armazenamento de nutrientes, auxiliando também na manutenção, no desempenho e na regulação da homeostase do organismo. Além disso, este órgão é responsável pela excreção de metabolitos residuais e pela desintoxicação de

drogas, xenobióticos e toxinas, sendo um alvo vulnerável de lesões causadas por substâncias tóxicas e radicais livres. Esses radicais são neutralizados pelas defesas antioxidantes celulares e a manutenção desse equilíbrio é crucial para o funcionamento normal do organismo (Zengin et al., 2018).

Plantas medicinais contendo compostos fenólicos têm sido intensamente exploradas devido à sua capacidade hepatoprotetora contra danos induzidos quimicamente, *in vivo* ou *in vitro*. Os constituintes naturais das plantas parecem diminuir as lesões hepáticas frequentemente causadas por reações oxidativas, que promovem a peroxidação lipídica em tecidos hepáticos (Zengin et al., 2018).

A superprodução crónica de ROS e o stress oxidativo têm sido relacionados ao desenvolvimento de cancro, uma vez que se verificou que esta superprodução danifica o ADN e provoca mutações celulares que mais tarde se podem transformar em tumores (Schulz & Chim, 2019).

Surgiram algumas evidências que é através da modulação de múltiplos alvos moleculares que os frutos de *Rubus idaeus* têm atividades quimiopreventivas e quimioterapêuticas, tornando-os ideias para a prevenção e tratamento do cancro. Na via intrínseca, o tratamento com antocianinas nas células malignas vai aumentar o potencial da membrana mitocondrial, ajudando na libertação do citocromo c e na modulação de proteínas anti e pró apoptóticas dependentes da caspase, ficando, deste modo, um processo mais facilitado. Na via extrínseca, dá-se a modulação da expressão de moléculas FAS (recetor da apoptose) e FASL (FAS ligante) em células cancerígenas, induzida por antocianinas, que vai resultar na apoptose dessas células (Teng et al., 2017).

2.5.4. Atividade anti-inflamatória

A inflamação é uma resposta fisiológica à lesão, agentes patogénicos ou alergénios, em que o local afetado pode apresentar perda de função, dor, calor, vermelhidão e inchaço. Os macrófagos são as principais células envolvidas nas respostas inflamatórias, estes ativam uma superprodução de mediadores inflamatórios, como interleucinas (IL1 β , IL-6, IL-8), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator nuclear kappa B (NF- κ B), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), cicloxigenase-2 do tipo indutível (COX-2), prostaglandina E2 (PGE2), 5-lipoxigenase (5-LOX) e sintase induzida do óxido nítrico (iNOS) (Barreiro et al., 2016).

Doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes *Mellitus* tipo II e cancro, estão associadas a respostas inflamatórias crónicas e, conseqüentemente, à superprodução de

mediadores inflamatórios, que, por sua vez, está relacionada ao aumento do risco de doenças crônicas. A inibição destes mediadores pode ser benéfica na atenuação da resposta inflamatória nessas doenças (Schulz & Chim, 2019).

Processos inflamatórios não infecciosos têm sido implicados na etiologia de doenças como obesidade, esclerose múltipla e diabetes *Mellitus* tipo II. Estas doenças apresentam concentrações elevadas de marcadores inflamatórios e de células inflamatórias ativadas no local do tecido afetado e na circulação sistêmica. A inflamação patológica envolve a perda de tolerância e/ou processos regulatórios disfuncionais (Barreiro et al., 2016).

Quando em contato com o organismo humano, o extrato de *Rubus idaeus* atua em várias frentes, por exemplo, em fatores de transição cardíaca, genes e proteínas que estão relacionados com a inflamação e com a atividade antioxidante (Kirakosyan et al., 2018). Um estudo efetuado com ratos evidencia que a fração de compostos fenólicos da framboesa vermelha apresenta efeitos anti-hipertensivos, conseqüentemente há uma melhoria da disfunção endotelial vascular (Kirakosyan et al., 2018).

Jean-Gilles (2012) publicou um estudo *in vivo* com ratos com artrite reumatoide induzida por adjuvante vivo (suspensão de *Mycobacterium tuberculosis* em esqualeno) em que foi observado que o extrato de *Rubus idaeus* tem um efeito protetor na cartilagem articular destes e induz efeitos anti-inflamatórios.

2.6. Absorção e metabolismo de compostos bioativos

Após a ingestão de framboesas vermelhas, os polifenóis, ou pelo menos uma parte, ficam biodisponíveis nos órgãos sistêmicos, através da absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Em geral, os componentes polifenólicos sofrem modificações estruturais antes de serem absorvidos a nível sanguíneo (Burton-Freeman, Sandhu, & Edirisinghe, 2016; Cao, Muccitelli, Sánchez-Moreno, & Prior, 2001). Algumas das antocianinas podem ser absorvidas intactas na sua forma glicosilada, enquanto outras podem ser hidrolisadas em agliconas, degradadas em compostos fenólicos ou passar para o cólon onde são catabolizadas em ácidos fenólicos pela microbiota intestinal antes da absorção (Zhang, Sandhu, Edirisinghe, & Burton-Freeman, 2018).

As estruturas que escapam da absorção do intestino delgado seguem para o cólon, onde são convertidas em ácidos fenólicos por microrganismos presentes no intestino grosso; seguidamente são excretados nas fezes ou absorvidos pela circulação mesentérica.

Os produtos metabólicos do cólon e os fenólicos desconjugados e as estruturas de aglicona do trato digestivo superior sofrem metabolismo de fase I e II no intestino delgado, fígado e/ou rim, resultando em metabolitos metilados, glucuronidados e sulfoconjugados. Os metabolitos resultantes circulam no sangue e são transportados para vários tecidos e órgãos (Burton-Freeman et al., 2016).

Alguns metabolitos podem nunca chegar à circulação geral devido ao refluxo de volta ao lúmen do intestino, após a captação inicial do enterócito ou devido à recirculação entero-hepática, pois a maioria dos metabolitos é excretada pelos rins (Burton-Freeman et al., 2016). Através do metabolismo humano, são produzidas inúmeras substâncias nocivas, entre estas as ROS, e os processos endógenos efetivos de desintoxicação e neutralização precisam de funcionar adequadamente para evitar a ocorrência de danos (Martins et al., 2016). A superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) são as enzimas mais importantes (consideradas enzimas primárias) envolvidas na eliminação direta de ROS (radical hidroxilo, radical superóxido, peróxido de hidrogénio, radical peroxilo, hidroperóxido, oxigénio singleto), através do metabolismo destes intermediários oxidativos tóxicos. Por outro lado, as enzimas secundárias glutathione redutase (GR), glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH) e glutathione-S-transferase (GST) estão envolvidas na desintoxicação de ROS, diminuindo os níveis de peróxido ou mantendo um fornecimento correto de intermediários metabólicos (como por exemplo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP)), crucial para um ótimo funcionamento das enzimas antioxidantes primárias (Martins et al., 2016).

2.7. Extração e deteção de moléculas bioativas

Uma enorme variedade de procedimentos de extração sólido-líquido está disponível para recuperar compostos de interesse de matrizes naturais (Chemat et al., 2017; Zhu et al., 2017). Concisamente, a extração sólido-líquido consiste em manter a amostra sólida (geralmente em forma de pó) em contato direto com um solvente por um tempo específico, aplicando um certo nível de energia (calor convencional, ultrassom ou radiação de micro-ondas, alta pressão, etc.) (Zhu et al., 2017).

Os procedimentos sólido-líquido compreendem os métodos convencionais, tais como extrações de Soxhlet e maceração. Estes métodos são relativamente fáceis de realizar e acessíveis; no entanto, vários autores apontam algumas desvantagens, que estão

associadas principalmente à sua aplicação a nível industrial, ou seja, o uso de grandes quantidades de solvente e longos tempos de extração (Azmir et al., 2013). Assim, a aplicação de diferentes técnicas de extração, como alta pressão hidrostática, campo elétrico pulsado, extração ultrassónica e extração assistida por micro-ondas, pode aumentar a velocidade de extração e rendimento, ou seja, é possível escolher um sistema de extração mais ecológico, com um desempenho melhor do que extração convencional. No entanto, os métodos convencionais ainda são importantes a nível industrial, principalmente devido à falta de resultados comparativos mostrando as vantagens das técnicas modernas alternativas (Azmir et al., 2013).

Nas últimas décadas, tem sido crescente o interesse em compostos bioativos o que conduziu a diversos estudos, nomeadamente no âmbito da sua caracterização. É de máxima relevância analisar o seu comportamento, mas também, determinar as relações entre as moléculas encontradas e as atividades que desempenham (Lockowandt et al., 2019). Ao longo dos últimos anos, várias técnicas de análise de moléculas bioativas têm sido desenvolvidas em diferentes matrizes, a fim de analisar as suas atividades.

A espectroscopia, a eletroquímica e a quimioluminescência são algumas das técnicas que permitem avaliar a atividade antioxidante, conferida por diferentes compostos, presentes nas matrizes vegetais. Contudo, estas não permitem identificar exatamente qual a molécula individual responsável por este potencial (Carocho & Ferreira, 2013). Para tal, e com o propósito de corresponder de forma completa aos objetivos dos estudos, outras técnicas de determinação de moléculas individuais têm vindo a ser otimizadas. A técnica de deteção mais comum consiste na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplada a diferentes dispositivos de deteção como o MS (espectroscopia de massa), DAD (detetor de foto díodos), UV-Vis (ultravioleta – visível) e fluorescência (Barros et al., 2012; Lockowandt et al., 2019).

3. OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivos a caracterização química e nutricional e a avaliação das propriedades bioativas *in vitro* de frutos de *Rubus idaeus* L., visando dar um contributo para o desenvolvimento de uma alegação de saúde. Os objetivos principais são os seguintes:

- 🌸 Avaliar o valor nutricional da framboesa, nomeadamente os teores de humidade, proteína, gordura, cinzas e hidratos de carbono e o valor energético;
- 🌸 Analisar o perfil em açúcares livres, ácidos orgânicos, ácidos gordos, tocoferóis e compostos fenólicos (antociânicos e não antociânicos) da framboesa;
- 🌸 Avaliar as propriedades bioactivas *in vitro* de extratos hidroetanólicos de framboesa, nomeadamente as atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e citotóxica para linhas tumorais e não tumorais.



4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Padrões e Reagentes

Para as análises químicas e nutricionais. A mistura padrão de 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (referência 47885-U) foi obtida na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), bem como os padrões de açúcares (D(-)-frutose, D(+)-sacarose, D(+)-glucose, D(+)-trealose, D(+)-melezitose e D(+)-rafinose penta-hidratada), ácidos orgânicos (ácido L(+)-ascórbico, ácido cítrico e ácido fumárico), tocoferóis (isoformas α , λ e δ) e o Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). Os padrões (cianidina-3-*O*-glucósido, ácido cafeico e ácido clorogénico) para análise de compostos fenólicos foram adquiridos na Extrasynthese (Genay Cedex, França). A solução de Tocol racémico e o padrão de tocoferóis foram adquiridos na Matreya (Pleasant Gap, PA, EUA). Os solventes etanol absoluto (99,9%), acetonitrilo (99,9%), acetato de etilo (99,8%) e *n*-hexano (95%), de grau HPLC, foram adquiridos na Pronalab (Lisboa, Portugal). Outros solventes de grau analítico: éter etílico (Lab-Scan, Lisboa, Portugal), tolueno e ácido sulfúrico também foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O metanol e outros reagentes de grau analítico foram obtidos de fontes comuns.

Para o estudo das bioatividades. Reagentes como a sulforrodamina B (SBR), o ácido tricloroacético, o lipopolissacarídeo (LPS), o DMSO, a dexametasona, a elipticina e o trisaminometano (Tris) foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). Na Gibco Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, Califórnia, EUA) foram adquiridos o soro fetal bovino (FBS), a solução de penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100 mg/mL, respetivamente), a L-glutamina, a tripsina-EDTA, a solução salina equilibrada de Hank's (HBSS) e o meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). O corante cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT) foi adquirido na Panreac Applichem (Barcelona, Espanha). O Mueller-Hinton agar (MHB) foi adquirido na BioLab® (Budapeste, Hungria).

A água utilizada em todos os ensaios foi tratada previamente à sua utilização pelo sistema de purificação Milli-Q-Water (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, EUA).

4.2. Preparação do material vegetal

Framboesas frescas da cultivar “Kweli”, fornecidas pela empresa “Ponto Agrícola Unipessoal, Lda”, de Tabuado, Marco de Canavezes, Portugal, foram pesadas, liofilizadas (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EUA) e reduzidas a um pó fino (~20 mesh) que foi homogeneizado para obter uma amostra representativa e guardado a -20 °C para posterior análise.

4.3. Avaliação da composição nutricional

4.3.1. Composição centesimal e valor energético

A composição em macronutrientes foi avaliada através de metodologias oficiais de análise de alimentos da AOAC (AOAC International, 2016). Para tal, foi determinado o teor de proteína, gordura, hidratos de carbono, cinzas e humidade e o valor de energia.

O teor em proteínas foi determinado pelo método de macro-Kjeldahl (AOAC 991.02), utilizando um destilador e titulador automático (“Pro-Nitro A”, JP Selecta) (**Figura 2**). O método baseia-se na análise da quantidade de azoto (N) presente na amostra. Para tal, uma massa conhecida de amostra (~0,5 g) foi digerida com ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), ocorrendo a digestão da matéria orgânica e consequente formação de um sal inorgânico, o sulfato de amónio $((NH_4)_2SO_4)$, no qual é retido o N. De seguida, a solução foi alcalinizada por adição de hidróxido de sódio (NaOH) para promover a libertação de N na forma de amoníaco, NH_3 . O amoníaco foi seguidamente destilado e recolhido numa solução de ácido de concentração conhecida, nomeadamente H_2SO_4 (0,1 M). Por fim, foi feita uma titulação com NaOH (0,1 M), utilizando o indicador vermelho de metilo que permitiu quantificar o N presente na amostra (AOAC 991.02). A quantidade de N foi multiplicada pelo fator de conversão 6,25 para obter o valor de proteína que foi expresso em g por 100 g de massa fresca (fw).

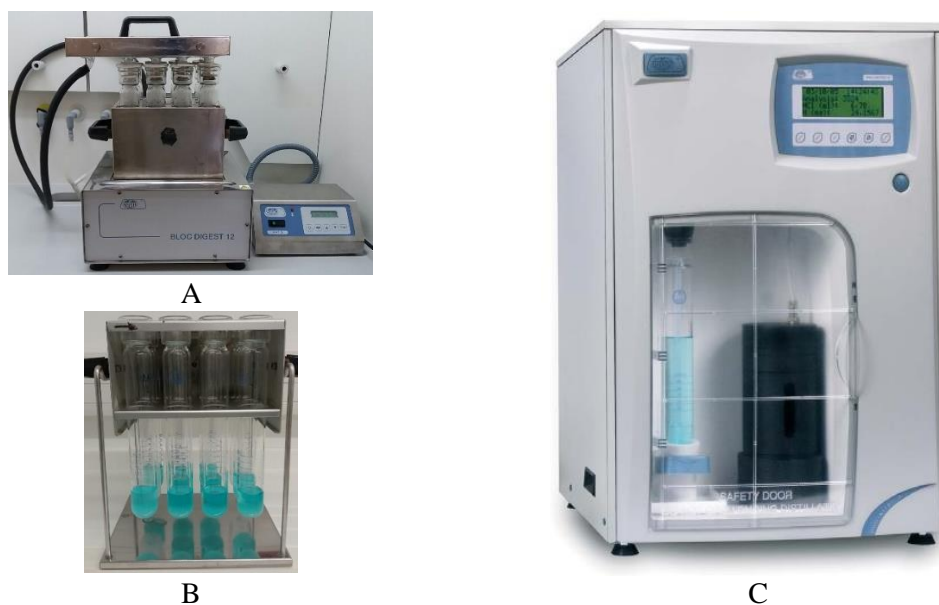


Figura 2 - Placa de digestão (A), tubos com amostras digeridas (B) e equipamento de destilação e titulação automática (C) para determinação dos teores de proteína.

O teor de gordura foi determinado através da extração de uma massa conhecida de amostra (~1,5 g) num aparelho de Soxhlet (**Figura 3A**), utilizando éter de petróleo como solvente de extração, durante aproximadamente 7 h (AOAC 989.05). O resultado foi expresso em g por 100 g de massa fresca (fw).



Figura 3 - Aparelho de Soxhlet usado na extração de gordura (A) e mufla usada na determinação do teor de cinzas (B).

Para determinação do teor de cinzas, uma massa conhecida de amostra (250 mg) foi incinerada numa mufla a 600 °C (**Figura 3B**) durante 5 h. Após inceneração, o teor de cinzas foi calculado como base na diferença de massas (AOAC 935.42) e expresso em g por 100 g de massa fresca (fw).

Para determinação do teor de humidade presente na amostra, colocou-se uma quantidade conhecida de amostra (1 g) na estufa (105 °C) até se obter uma massa constante, de acordo com a **Equação 1**.

$$\text{Humidade} = \frac{(P_{\text{fresco}} - P_{\text{seco}}) \times 100}{P_{\text{fresco}}} \quad \text{Equação 1}$$

O teor de hidratos de carbono foi calculado por diferença, de acordo com a **Equação 2**, e o resultado expresso em g por 100 g de massa fresca.

$$\text{Hidratos de carbono} = 100 - (g \text{ proteínas} + g \text{ gordura} + g \text{ cinzas}) \quad \text{Equação 2}$$

A energia foi determinada de acordo com a **Equação 3** e expressa em kcal por 100 g de massa fresca.

$$\text{Energia} = 4 \times (g \text{ proteínas} + g \text{ hidratos de carbono}) + (9 \times g \text{ gordura}) \quad \text{Equação 3}$$

4.3.2. Análise de açúcares livres

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), conforme descrito anteriormente por Pinela et al. (2012). A amostra (1 g) foi enriquecida com melezitose (utilizada como padrão interno, 25 mg/mL) e extraiu-se com 40 mL de etanol (80/20, v/v), num banho a 80 °C (Julabo, SW22; Seelbach, Alemanha), durante 1 h e 30 min, com agitação a cada 15 min. Posteriormente, o sobrenadante obtido foi centrifugado (centrífuga refrigerada K24OR, Centurion, Sussex Ocidental, Reino Unido) a 15,000 g durante 10 min e transferido para um balão de vidro para evaporar a fração etanólica, recorrendo-se a um evaporador rotativo (Büchi R-210, Flawil, Suíça) (60 °C, pressão reduzida). A fase aquosa foi lavada 3 vezes com éter dietílico (10 mL), tendo sido, seguidamente, os restos do mesmo evaporados. Ao resíduo seco obtido, foi adicionada água até perfazer um volume final de 5 mL e filtrou-se 1,5 mL do mesmo (filtros de nylon de 0,2 µm da Whatman) para um vial, para posterior análise do perfil em açúcares no sistema referido.

O sistema de HPLC (**Figura 4A**) encontra-se equipado com uma bomba (Knauer, Sistema Smartline 1000, Berlim, Alemanha), um sistema desgaseificador (Smartline manager 5000), um amostrador automático (AS-2057 Jasco, Easton, Maryland, EUA) e um detetor de índice de refração (Knauer Smartline 2300). A separação cromatográfica foi obtida através de uma coluna Eurospher 100-5 NH2 (4,6 × 250 mm, 5 µm, Knauer), que operou a uma temperatura de 35 °C (7971 R Grace). Como fase móvel foi usado acetonitrilo/água desionizada (70:30; v/v) com um caudal de 1 mL/min, sendo o volume de injeção de 10 µL. Para a identificação dos compostos, recorreu-se ao software Clarity 2,4 Software (DataApex, Podohradská, República Checa), com o qual se compararam os tempos de retenção relativos dos picos da amostra, com padrões conhecidos. Os resultados foram obtidos pelo método do padrão interno e expressos em grama de composto por 100 g de massa fresca (fw).

4.3.3. Análise de ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos foram determinados num sistema de HPLC (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) acoplado a um detetor de díodos (DAD), de acordo com um procedimento descrito por Barros et al. (2013). A extração foi realizada ao abrigo da luz, adicionando ácido metafosfórico (4,5%; 25 mL) à amostra (~500 g), mantendo as condições de temperatura ambiente e agitação constante (150 rpm) durante 20 min. Após

extração, a mistura foi filtrada através de papel de filtro Whatman n.º 4 e filtros de nylon de 0,2 µm para análise no sistema de HPLC (**Figura 4B**).

A separação dos ácidos orgânicos foi obtida através de uma coluna SphereClone (Phenomenex, Torrance, California, EUA) de fase inversa C₁₈ (5 µm, 250 mm × 4,6 mm i.d.) termostaticada a 35 °C, sendo a eluição realizada com ácido sulfúrico (3,6 mM) com um caudal de 0,8 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL. A detecção dos ácidos orgânicos foi conseguida recorrendo ao sistema DAD, aplicando os comprimentos de onda de 215 nm e 245 nm (para o ácido ascórbico). A quantificação dos ácidos orgânicos foi feita por comparação da área dos picos registados nos comprimentos de onda referidos e com base em curvas de calibração obtidas a partir dos padrões do respetivo composto. Os resultados foram expressos em mg de composto por 100 g de massa fresca (fw).



Figura 4 - Equipamentos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usados na análise de açúcares livres e tocoferóis (A) e de ácidos orgânicos (B).

4.3.4. Análise de ácidos gordos

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID) de acordo com a metodologia previamente descrita por Pinela et al. (2012). Ao extrato lipídico obtido pela extração de Soxhlet (ver secção 3.3.1.) foram adicionados 5 mL de uma solução de metanol/ácido sulfúrico/tolueno, na proporção 2:1:1 (v/v/v) e a mistura permaneceu num banho (Julabo, SW22; Seelbach, Alemanha) a uma temperatura de 50 °C (com agitação a 160 rpm) durante cerca de 12 h. Após o processo de reprivatização, foi adicionada água desionizada (3 mL) na mistura para potenciar a separação de fases. De seguida adicionou-se éter dietílico (3 mL) para permitir a recuperação dos esteres metílicos de ácidos gordos (FAME); ambos os passos foram realizados com agitação em vórtex. Após a separação de fases, transferiu-se o

sobrenadante para um vial, no qual se adicionou previamente sulfato de sódio anidro, com o intuito de desidratar o sobrenadante. Por fim, este foi filtrado para um vial através de filtros de nylon de 0,2 µm da Whatman, para posterior análise no sistema de GC.

O perfil de ácidos gordos foi obtido através de um sistema de GC (Modelo DANI GC 1000) equipado com um injetor *split/splitless*, um detetor de ionização de chama (260 °C) e uma coluna Zebron-Kame (30 m × 0,25 mm ID × 0,20 µm df; Phenomenex, Lisboa, Portugal). O programa de temperatura aplicado foi o seguinte: temperatura inicial de 100 °C, durante 2 min; aumento progressivo da temperatura: 10 °C/min até 140 °C; 3 °C/min até 190 °C; 30 °C/min até 260 °C que permaneceu durante 2 min. O hidrogénio foi o gás de transporte utilizado, com um caudal de 1,1 mL/min. A injeção *split* (1:50) foi realizada a 250 °C, onde foi injetado 1 µL da amostra. A identificação de ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos de FAME das amostras com os do padrão. Para o processamento dos resultados, recorreu-se ao software CSW 1,7 (DataApex 1,7, Praga, República Checa), e estes foram expressos em percentagem relativa (%) de cada ácido gordo.

4.3.5. Análise de tocoferóis

Os tocoferóis foram analisados através de um sistema HPLC acoplado a um detetor de fluorescência (HPLC-FL), segundo um procedimento descrito por Pinela et al. (2012). Para realizar o processo de extração, à amostra de framboesa (500 mg) foi adicionada uma solução de hidroxitolueno butilado (BHT) em hexano (10 mg/mL; 100 µL) e uma solução de tocol (usado como padrão interno - PI) em hexano (50 µg/mL; 400 µL). A amostra foi, de seguida, homogeneizada com 4 mL de metanol, levada ao vórtex durante 1 min e ainda foram adicionados 4 mL de hexano e levado ao vórtex mais 1 min. Após homogeneização da amostra, adicionou-se uma solução aquosa concentrada de NaCl (2 mL), levou-se ao vórtex durante 1 min, e centrifugou-se a 4000g durante 5 min a 10 °C. O sobrenadante obtido foi transferido para um vial, previamente envolvido em papel de alumínio e rodeado de gelo, e foi re-extraído mais duas vezes com hexano. Depois disto, adicionou-se Na₂SO₄ anidro ao extrato para o desidratar e foi levado à secura sob corrente de azoto. Por fim, redissolveu-se o extrato obtido em *n*-hexano (2 mL) e filtrou-se através de um filtro nylon de 0,2 µm da Whatman para um vial âmbar para posterior análise.

O sistema HPLC-FL utilizado na análise dos tocoferóis é mostrado na **Figura 4A**. O detetor (FP-2020; Jasco) foi programado para excitação (λ_{ex}) a 290 nm e emissão (λ_{em}) a 330 nm. A separação cromatográfica foi obtida com uma coluna de fase normal de Poliamida II (250 mm \times 4,6 mm i.d., 5 μ m, YMC Waters, Milford, EUA) a uma temperatura de 35 °C. Como fase móvel, usou-se uma mistura de *n*-hexano e acetato de etilo (70:30, v/v) com um caudal de 1 mL/min, sendo o volume de injeção de 10 μ L. A identificação dos compostos foi feita através de comparações cromatográficas com os compostos padrão. A quantificação foi obtida pelo método do padrão interno, com base em curvas de calibração construídas com os compostos padrão. Os dados foram tratados com o software Clarity 2,4 (DataApex, Podohradská, República Checa) e os resultados foram expressos em μ g de composto por 100 g de massa fresca (fw).

4.4. Avaliação da composição fenólica e bioatividades

4.4.1. Preparação do extrato hidroetanólico

Pesou-se ~1 g de amostra de framboesa para um gobelé e adicionou-se uma mistura de etanol: água (80:20, v/v; 30 mL). Esta mistura foi acidificada com ácido cítrico (até pH 3) para obtenção do extrato para a análise de antocianinas. A mistura foi colocada sob agitação durante uma hora à temperatura ambiente e depois filtrada através de filtro de papel para um balão de vidro esmerilado de 250 mL, previamente pesado em balança analítica. Os passos anteriores foram repetidos mais uma vez, ou seja, o resíduo da amostra foi re-extraído nas mesmas condições. O etanol presente no filtrado recolhido foi evaporado sob pressão reduzida a 40 °C a fase aquosa foi congelada e liofilizada.

4.4.2. Análise de compostos fenólicos antociânicos e não antociânicos

Para purificação dos extratos de framboesa vermelha, utilizaram-se 5 mL dos mesmos (100 mg/mL H₂O). Estes foram passados através de uma coluna C18 SepPak® (Vac 3 cm³; Phenomenex, Califórnia, EUA) previamente ativada com 5 mL de metanol e, posteriormente, com 5 mL de água. Os açúcares e as substâncias mais polares foram removidas com 15 mL de água e os compostos fenólicos foram eluídos com 5 mL de metanol. Os extratos metanólicos foram concentrados sob pressão reduzida, redissolvidos numa solução de MeOH/H₂O (20:80, v/v; 1 mL) acidificada com ácido cítrico

(até pH 3) e seguidamente filtrados através de discos descartáveis de 0,22 µm para posterior análise.

A análise de compostos fenólicos dos extratos purificados de framboesa foi efetuada usando um sistema Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) (**Figura 5**) de acordo com os procedimentos descritos por Lockowandt et al. (2019). O sistema é constituído por uma bomba quaternária, um injetor automático (5 °C), um desgaseificador e um compartimento de coluna provido de um termostato automatizado. Foi utilizado um DAD acoplado a um espectrómetro de massa (MS); a separação ocorreu através de uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C₁₈ (4,6 mm × 150 mm, 3 µm, Waters) a 35 °C. A análise foi efetuada nos comprimentos de onda de 280, 330, 370 e 520 nm (este último para antocianinas). A deteção MS foi feita usando um espectrofotómetro de massa Ion Trap Linear LTQ XL (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) com uma fonte de ionização *electrospray* (ESI) e tendo como gás de arraste o azoto (50 psi). Esta foi realizada em modo negativo (para os compostos não antociânicos) e positivo (para as antocianinas). O varrimento abrangeu uma amplitude de massa de m/z 100 a 1500. A energia de colisão foi de 20 (unidades arbitrárias).



Figura 5 - Equipamento de cromatografia líquida acoplado a um espectrómetro de massa (HPLC-DAD-ESI/MSⁿ) onde foi realizada a análise do perfil fenólico da framboesa vermelha.

A identificação dos compostos foi conseguida por comparação cromatográfica com padrões comerciais e com base na informação disponível na literatura. Para tal, foram considerados os tempos de retenção e os espectros de UV-Vis e massa obtidos. Para quantificação, construíram-se retas de calibração (5-200 µg/mL) a partir dos padrões, com base no sinal UV-Vis de cada um dos compostos. Os dados foram tratados com o *software* Xcalibur (Thermo Finnigan). A quantidade de compostos não antociânicos e antociânicos foi dada em µg e mg, respetivamente, por g de extrato purificado.

4.4.3. Avaliação da atividade antioxidante

4.4.3.1. Inibição da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O ensaio foi realizado seguindo o procedimento descrito por Pinela et al. (2012). Inicialmente, foi preparada uma suspensão de cérebro de porco. Para isso, num tubo de Falcon adicionou-se uma porção de cérebro de porco para duas porções de uma solução tampão de tris-HCl (20 mM, pH 7,4) e, de seguida, agitou-se vigorosamente até o tecido cerebral ficar completamente dissociado. Após centrifugação da suspensão a 1800 rpm por 10 min, recolheu-se o sobrenadante para posterior utilização e descartou-se o precipitado. Uma vez preparada a suspensão de cérebro, os extratos foram dissolvidos em água a uma concentração de 20 mg/mL, a qual foi usada para fazer outras soluções por diluição sucessiva até 0,04 mg/mL. A 200 µL de cada uma das diluições de extrato anteriores, foram adicionados 100 µL de ácido ascórbico, 100 µL de sulfato ferroso e 100 µL de suspensão de cérebro de porco. Posteriormente, as misturas foram incubadas em banho termostático a 37,5 °C durante 1 h. Depois disso, foram adicionados 500 µL de ácido tricloroacético (TCA, 28%) e 380 µL de ácido tiobarbitúrico (2%) a todos os tubos de ensaio, os quais foram novamente colocados em banho a 80 °C durante 20 min. Por fim, procedeu-se à centrifugação dos mesmos a 3000 rpm durante 5 min e à leitura do sobrenadante a 532 nm num espectrofotómetro UV-Vis (Specord 200, Analytik Jena, Jena, Alemanha). O Trolox foi usado como controlo positivo. Também foi preparado um branco com o solvente de extração em vez de extrato. A percentagem de inibição foi calculada de acordo com a **Equação 4**, onde A e B representam as absorvâncias das soluções controlo e de extrato, respetivamente.

$$\text{Percentagem de inibição (\%)} = 100 \frac{A - B}{A} \quad \text{Equação 4}$$

Os resultados foram expressos em valores de EC₅₀ (µg/mL), ou seja, a concentração de extrato necessária para atingir 50% do efeito antioxidante.

4.4.3.2. Inibição da hemólise oxidativa

Para determinar a atividade anti-hemolítica foi seguido o ensaio OxHLIA descrito por Lockowandt et al. (2019). Foi utilizada uma suspensão de eritrócitos isolados de sangue de ovelha (**Figura 6A**) em solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7,4) a 2,8 % (v/v). Para este ensaio, o extrato de framboesa foi dissolvido em PBS a uma

concentração de 3,5 mg/mL e depois preparadas mais cinco concentrações por diluição sucessiva. Numa placa de 48 poços de fundo plano, 200 μ L de suspensão de eritrócitos foram misturados com 400 μ L de extrato de framboesa, PBS (controlo) ou água destilada (para hemólise completa) (**Figura 6B**). O Trolox foi usado como controlo positivo. A placa foi pré-incubada a 37 °C com agitação contínua durante 10 min. Após pré-incubação, foram adicionados 200 μ L de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida)di-hidroclorido (AAPH) (160 nM em PBS) e a densidade ótica foi medida num leitor de microplacas (ELX800, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA) a um comprimento de onda de 690 nm. De seguida, a placa foi novamente incubada nas mesmas condições, com leituras a cada ~10 min até ocorrer a hemólise total.

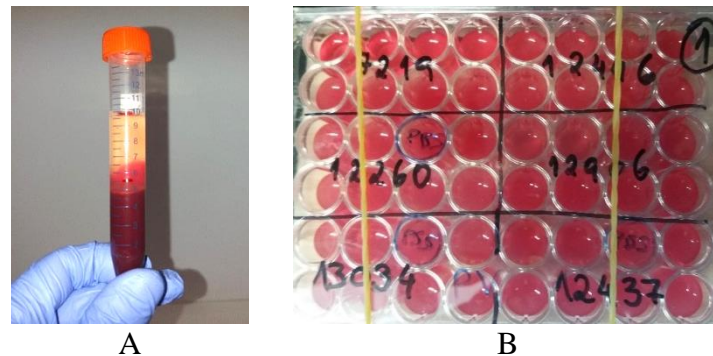


Figura 6 - Tubo de Falcon ilustrando o isolamento dos eritrócitos a partir de sangue de ovelha (A) e placa de 48 poços com a mistura a ser incubada a 37 °C (A).

A percentagem da população de eritrócitos (P) que permaneceu intacta foi calculada de acordo com a **Equação 5**, onde S_0 e S_t correspondem às densidades óticas da amostra a 0 e t min, respetivamente, e HC_0 corresponde à densidade ótica da mistura onde se induziu hemólise completa com a água destilada no tempo 0.

$$P(\%) = 100 \left(\frac{S_t - HC_0}{S_0 - HC_0} \right) \quad \text{Equação 5}$$

O tempo necessário para atrasar a hemólise (Δt) foi calculado usando a **Equação 6**, onde Ht_{50} é o tempo (obtido graficamente a partir da curva de hemólise de cada uma das concentrações do extrato) necessário para que 50% de P seja hemolisada.

$$\Delta t (\text{min}) = Ht_{50}(\text{amostra}) - Ht_{50}(\text{controlo}) \quad \text{Equação 6}$$

Os valores de Δt obtidos foram correlacionados com as diferentes concentrações dos extratos, de modo a calcular a concentração de extrato necessária para retardar a

hemólise durante um determinado período de tempo. Os resultados foram expressos em valores de IC₅₀ (µg/mL) a um Δt de 60 min, ou seja, a concentração de extrato necessária para manter intacta 50% da população de eritrócitos durante 60 min.

4.4.3.3. Inibição da descoloração do β-caroteno

Para avaliação da capacidade de inibição da descoloração do β-caroteno (β-CBI) foi seguida a metodologia descrita por Pinela et al. (2012). Começou-se por dissolver os extratos em água, ficando a uma concentração de 5 mg/mL e foram realizadas diluições sucessivas até 0,04 mg/mL. Foi preparada uma solução de β-caroteno, dissolvendo 2 mg deste composto em 10 mL de clorofórmio. De seguida, 2 mL desta solução foram transferidos para um balão de fundo redondo e procedeu-se à remoção do clorofórmio num evaporador rotativo. Em seguida, foram adicionados 40 mg de ácido linoleico e 400 mg de emulsificante Tween 80. Depois de misturar os reagentes com uma espátula, foram adicionados 100 mL de água destilada e a mistura foi agitada vigorosamente para formar uma emulsão. Posteriormente, adicionaram-se 4,8 mL da emulsão aos tubos de ensaio contendo 0,2 mL das seis diluições de extrato previamente preparadas. Após a agitação dos tubos de ensaio num vórtex, a absorvância foi lida a 470 nm. Depois disto, os tubos foram incubados a 50 °C com agitação (50 rpm) e, após 2 h, a absorvância foi lida novamente. A percentagem de inibição da descoloração foi calculada usando a **Equação 7**, onde [β-caroteno]₀ e [β-caroteno]₂ correspondem à absorvância inicial e após 2 h de incubação, respetivamente. O Trolox foi usado como controlo.

$$\beta\text{-CBI} = 100 \frac{[\beta\text{-caroteno}]_2}{[\beta\text{-caroteno}]_0} \quad \text{Equação 7}$$

O resultado foi dado em valor de EC₅₀ (µg/mL), o qual foi calculado por interpolação da representação gráfica da percentagem de inibição contra a concentração do extrato.

4.4.4. Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada pelo método de microdiluição colorimétrica (usando INT como corante), segundo o procedimento descrito por Soković et al. (Soković, Glamočlija, Marin, Brkić, & Griensven, 2010). Os microrganismos utilizados foram bactérias Gram (+), nomeadamente *B. cereus* (ATCC 25923) e *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973), e bactérias Gram (-), nomeadamente *Escherichia coli*

(ATCC 25922) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311). Também foram testados os fungos *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Aspergillus fumigatus* (ATCC 1022), *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* (isolado de alimentos) e *Trichoderma viride* (IAM 5061). Todos os microrganismos foram obtidos no Laboratório de Micologia do Instituto de Investigação Biológica “Sinisa Stankovic”, da Universidade de Belgrado, na Sérvia.

Para a realização do ensaio, os extratos foram dissolvidos em solução de DMSO a 5% e meio de cultura a 95% na concentração de 5 mg/mL. A cada um dos 96 poços da microplaca foram adicionados 100 µL de meio de soja digerido (TSB). No primeiro poço de cada coluna foram adicionados 40 µL das soluções de extrato previamente preparadas, das quais foram feitas diluições sucessivas para uma concentração de 0,05 mg/mL.

As estirpes bacterianas e fúngicas foram preparadas com base na densidade ótica, lida por um espectrofotômetro (UV-120-01, SHIMADZU, Kyoto, Japão), ajustado para 0,50 nm da escala McFarland, correspondendo a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. De seguida, foram adicionados 10 µL desses inóculos a cada um dos poços (uma microplaca para cada espécie de microrganismo) e incubados a 37 °C durante 24 h para as bactérias e a 28 °C durante 72 h para os fungos. Após a incubação, foram adicionados 40 µL de corante INT (0,2 mg/mL) a cada poço e incubados novamente durante 30 min a 37 °C. Este indicador apresenta coloração rosa quando existem microrganismos viáveis em solução e azul quando se encontram inviáveis; portanto, numa série de diluições sucessivas, o primeiro poço que apresente coloração rosa indica que essa concentração de extrato e qualquer concentração menor não é capaz de inibir o crescimento microbiano. Assim sendo, o poço imediatamente anterior (com coloração azul), indica a concentração mínima inibitória (CMI) de extrato. Para a determinação da concentração mínima bactericida e fungicida (CMB e CMF, menor concentração de extrato que diminui o crescimento bacteriano ou fúngico, respetivamente, em pelo menos 99.0%), semeou-se o conteúdo de cada poço em que não houve alteração de cor azul para rosa numa placa de Petri com meio sólido MHB. Após o plaqueamento, as placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h para as bactérias e a 28 °C durante 72 h para fungos. Para cada espécie de microrganismo, a placa com a menor concentração de extrato que não apresentou crescimento microbiano indicou a CMB ou CMF. Desta forma, os resultados foram expressos em CMI, CMB e CMF (mg/mL). Como controlo negativo, foram utilizados dois poços onde não foi adicionado extrato e, como controlo positivo, utilizou-se benzoato de sódio (E211) e metabissulfito de potássio (E224).

4.4.5. Avaliação da atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória foi avaliada através da monitorização da produção de óxido nítrico (NO) pela linha celular RAW 264.7 de macrófagos de rato, seguindo o procedimento descrito por Corrêa et al. (2015). Os extratos foram dissolvidos em DMSO (500 µL) e H₂O (500 µL) de modo a obter uma solução stock a 8 mg/mL, a partir da qual se procedeu a diluições sucessivas, obtendo as concentrações a testar (0,125 - 8 mg/mL). A linha celular RAW 264.7 (obtidas no Instituto DMSMZ – *Leibniz – Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*) foi cultivada em meio DMEM, suplementado com soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor (10 %), glutamina e antibióticos, e mantida numa incubadora a 37 °C com 5 % de CO₂ e sob uma atmosfera húmida. As células foram desagrupadas com um raspador de células. Uma alíquota da suspensão celular de macrófagos (300 µL) com uma densidade celular de 5×10^5 células/mL e com uma proporção de células mortas inferior a 5%, de acordo com o teste de exclusão do azul de Tripano, foi colocada em cada poço. A microplaca foi incubada durante 24 h sob as condições anteriormente indicadas de forma a permitir uma aderência e multiplicação favorável das células. Após esse período, as células foram tratadas com as diferentes concentrações de extrato (15 µL) e incubadas durante 1 h. De seguida, procedeu-se à sua estimulação das células com a adição de 30 µL da solução de lipopolissacarídeo (LPS, 1 mL/mL), as quais foram incubadas durante mais 24 h. Como controlo positivo foi utilizada dexametasona (50 mM) e como controlo negativo, amostras na ausência de LPS.

A quantificação de NO foi feita através da utilização de um kit do sistema de reagentes de Griess (soluções de nitrofenamida, etilenodiamina e nitrito) e através da curva de calibração de nitrito (nitrito de sódio, de 100 mM a 1,6 mM) preparada numa placa de 96 poços. O NO produzido foi determinado através da leitura da absorvância a 540 nm (leitor de microplacas ELX800 Biotek, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) e pela comparação com a reta de calibração do padrão ($y = 0,0063x + 0,1368$, $R^2 = 0,9989$). Os resultados foram calculados através da representação gráfica da percentagem de inibição da produção de NO *versus* a concentração de extrato, e expressos relativamente à concentração de extrato que inibe em 50% a produção de óxido nítrico, ou seja, valor de IC₅₀ (µg/mL).

4.4.6. Avaliação da atividade citotóxica

4.4.6.1. Linhas celulares tumorais

O potencial citotóxico dos extratos de framboesa foi avaliado utilizando o ensaio da sulforrodamina B (SRB), previamente descrito por Vaz et al. (2010). Foram utilizadas quatro linhas celulares tumorais humanas, nomeadamente NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HeLa (adenocarcinoma cervical), HepG2 (carcinoma hepatocelular), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), obtidas no Instituto DMSMZ – *Leibniz – Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*, todas elas mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL), componentes necessários para o seu crescimento. Os frascos de cultura foram mantidos numa incubadora a 37 °C e com 5% de CO₂, sob uma atmosfera húmida. As células foram utilizadas apenas quando apresentavam 70 a 80 % de confluência.

Uma massa conhecida de extrato (~8 mg) foi dissolvida em DMSO (500 µL) e H₂O (500 µL), tendo sido obtida uma solução stock a 8 mg/mL, a partir da qual se procedeu a diluições sucessivas obtendo as diferentes concentrações a testar (0,125–8 mg/mL). Uma alíquota (190 µL) da suspensão celular de cada uma das linhas testadas com uma concentração celular de 5×10^4 células/mL, foi incubada com uma alíquota de cada uma das concentrações de extrato (10 µL) em placas de 96 poços durante 48 h. Após incubação, prosseguiu-se para a fixação das células; para isso, foi adicionado TCA (10% *m/v*; 100 µL) previamente refrigerado e as placas foram incubadas 1 h a 4 °C, lavadas com água desionizada e, após secagem, foi adicionada uma solução de SRB (0,057%, *m/v*; 100 µL) e deixadas em repouso à temperatura ambiente durante 30 min. Para a remoção da SRB não aderida, as placas foram lavadas três vezes com uma solução de ácido acético (1%, *v/v*) e colocadas a secar. Por fim, a SRB aderida foi solubilizada com Tris (10 mM; 200 µL) e a absorvância foi medida a um comprimento de onda de 540 nm no leitor de microplacas Biotek ELX800. Como controlo positivo foi utilizada elipticina. O resultado foi expresso em termos de concentração de extrato com capacidade de inibir o crescimento celular em 50 %, ou seja, valor de GI₅₀ (µg/mL).

4.4.6.2. Linha celular não tumoral

Para realização do ensaio, foi preparada uma cultura primária de células de fígado de porco conforme descrito por Abreu et al. (2011). A preparação desta cultura celular,

designada por PLP2, foi feita a partir de fígado de porco obtido no matadouro local. O tecido de fígado foi lavado com uma solução salina equilibrada de Hank (HBSS), contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e foram obtidos explantes de $1 \times 1 \text{ mm}^3$. Estes foram colocados em frascos de 25 cm^2 contendo DMEM suplementado com SFB (10%), aminoácidos não essenciais (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL), e incubados a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ com 5% de CO_2 e atmosfera humidificada. O meio de cultura celular foi renovado no sentido de assegurar o crescimento celular, o qual foi acompanhado pela observação no microscópio com contraste de fase, a cada dois dias. As células foram sub-cultivadas e plaqueadas numa placa de 96 poços de forma a obter-se uma densidade de 1.0×10^4 células/poço. As diluições utilizadas para avaliar a citotoxicidade nesta cultura primária de células não tumorais foram as mesmas que se encontram descritas na secção anterior. A elipticina foi utilizada como controlo positivo. O resultado foi expresso em valor de GI_{50} (µg/mL).

4.5. Análise estatística

Os ensaios descritos foram realizados utilizando três amostras independentes analisadas em triplicado, sendo os resultados expressos como valores médios \pm desvio padrão. Para a atividade antioxidante, a existência de diferenças significativas entre o extrato de framboesa e o Trolox foi avaliada através de um teste t de Student, com valor de $p = 0,05$. Foram consideradas diferenças significativas entre as duas amostras quando o valor de p foi menor que 0,05. A homogeneidade das variâncias foi previamente testada aplicando um teste de Levene de igualdade de variâncias. A análise foi realizada no programa SPSS[®] (version 23 for Windows; IBM Corp., Armonk, NY, USA).



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Valor nutricional

A framboesa é um fruto com um consumo exponencial ao longo dos últimos anos devido, em parte, à sua composição em biomoléculas promotoras de saúde. Os resultados da caracterização do valor nutricional da framboesa vermelha são apresentados na **Tabela 3**. Verificou-se que 83,1% da framboesa é constituída por água. Os hidratos de carbono foram os macronutrientes mais abundante, com $16,12 \pm 0,01$ g/100 g de fruto fresco (fw). Seguiram-se as cinzas com $0,66 \pm 0,02$ g/100, as proteínas com $0,18 \pm 0,01$ g/100 g e, em menor quantidade, a gordura com apenas $0,132 \pm 0,005$ g/100 g. Pode-se verificar uma elevada quantidade de humidade contida nos frutos de framboesa, com valores de $83,1 \pm 0,2$ g/100 g. A nível energético, observou-se que, por cada 100 g de fruto consumido, a energia fornecida é de apenas $66,40 \pm 0,04$ kcal. Desta forma, a framboesa é um alimento adequado para dietas pouco calóricas e pobres em gordura.

Tabela 3 - Composição centesimal e valor energético da framboesa vermelha.

	Conteúdo (fw) ¹
Humidade (g/100 g)	$83,1 \pm 0,2$
Proteínas (g/100 g)	$0,18 \pm 0,01$
Cinzas (g/100 g)	$0,66 \pm 0,02$
Gordura (g/100 g)	$0,132 \pm 0,005$
Hidratos de carbono totais (g/100 g)	$16,12 \pm 0,01$
Energia (kcal/100 g)	$66,40 \pm 0,04$

¹Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

Vários estudos foram já realizados com framboesas, contudo os resultados dos parâmetros analisados apresentam algumas diferenças. Num estudo de Sousa (2007), os resultados mostram valores diferentes dos que são apresentados no presente estudo; contudo, a ordem decrescente de cada macronutriente é idêntica, sendo a humidade o parâmetro com a maior predominância, seguido dos hidratos de carbono, das cinzas, das proteínas e, por último, das gorduras.

De acordo com as tabelas de composição nutricional apresentadas pela PortFIR - Plataforma Portuguesa de Informação Alimentar (INSA, 2010), a framboesa apresenta valores inferiores de hidratos de carbono ($5,1$ g/100 g) e cinzas ($0,54$ g/100 g) e também de energia (49 kcal/100 g). Contudo, os valores apresentados para as proteínas ($0,9$ g/100 g), a gordura ($0,6$ g/100 g) e a humidade ($84,3$ g/100 g) são superiores ao do presente

estudo. Esta heterogeneidade de resultados pode estar relacionada com fatores genéticos, agronômicos e edafoclimáticos, tais como o tipo de cultivo aplicado na espécie de framboesa em estudo: as características do solo, as práticas culturais adotadas, a época de colheita e maturação do fruto, clima e exposição solar e local da exploração, entre outros (Faniadis, Drogoudi, & Vasilakakis, 2010).

Depois da água, os hidratos de carbono têm sido descritos como sendo o principal macronutriente nas bagas de *Rubus*. Teores de 85,3 a 86,6 g/100 g de massa seca (dw) já foram descritos para *R. ellipticus*, *R. niveus* e *R. idaeus* (Ahmad et al., 2015).

As framboesas e as amoras são frutos pobres em gordura. Num estudo de Ahmad et al. (2015), a framboesa vermelha apresentou cerca de 2,5 g/100 g fw de gordura. Apesar disso, Van Hoed et al. (2009) publicou um estudo que mostra que a quantidade de sementes nos frutos de *Rubus* pode influenciar o conteúdo lipídico, explicando assim a diferença de valores neste parâmetro em relação a outros estudos.

Segundo De Souza et al. (2014), os teores de proteína nas bagas de *R. idaeus* são de $1,00 \pm 0,08$ g/100 g fw, enquanto *R. niveus* apresentou um valor de $1,27 \pm 0,06$ g/100 g fw, valores superiores aos encontrados no presente estudo.

5.2. Composição em compostos individuais

5.2.1. Açúcares e ácidos orgânicos

Embora o desenvolvimento da doçura seja importante para a qualidade da framboesa, a acidez também influencia o sabor, ajudando a fornecer um equilíbrio açúcar-ácido desejável e necessário para obter um sabor agradável (Mditshwa, Magwaza, Tesfay, & Mbili, 2017).

Os resultados da composição da framboesa em açúcares livres e ácidos orgânicos encontram-se resumidos na **Tabela 4**. Relativamente à composição em açúcares, foram detetados dois monossacarídeos (a frutose e a glucose), dois dissacarídeos (a sacarose e a trealose) e um trissacarídeo (a rafinose). O perfil HPLC em açúcares na amostra estudada pode ser observado na **Figura 7**. Entre estes compostos hidrofílicos, o açúcar presente em maior quantidade foi a frutose ($2,42 \pm 0,03$ g/100 g fw), seguida da glucose ($2,13 \pm 0,09$ g/100 g fw), da sacarose ($1,41 \pm 0,02$ g/100 g fw) e, em menor quantidade, da trealose ($0,020 \pm 0,001$ g/100 g fw). O teor total em açúcares foi de $6,0 \pm 0,1$ g/100 g fw.

O teor de açúcares em *Rubus* pode variar entre cultivares e espécies silvestres. O estudo de Milivojević et al. (2011) reportou valores distintos dos do presente estudo,

sendo a glucose o açúcar detetado em maior quantidade em *Rubus idaeus*, com cerca de 38,3 mg/g fw. Quando existe um elevado teor de açúcar nestes frutos não significa obrigatoriamente que apresentam um sabor mais doce, pois a quantidade de ácidos orgânicos também é importante na percepção do sabor dos frutos (Milivojević et al., 2011).

Tabela 4 - Composição em açúcares e ácidos orgânicos da framboesa vermelha.

	Conteúdo (fw) ¹
Açúcares (g/100 g)	
Frutose	2,42 ± 0,03
Glucose	2,13 ± 0,09
Sacarose	1,41 ± 0,02
Trealose	0,020 ± 0,001
Rafinose	0,040 ± 0,000
Açúcares totais	6,0 ± 0,1
Ácidos orgânicos (mg/100 g)	
Ácido ascórbico	17 ± 1
Ácido cítrico	2718 ± 134
Ácido fumárico	1,5 ± 0,1
Ácidos orgânicos totais	2765 ± 136

¹Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão.

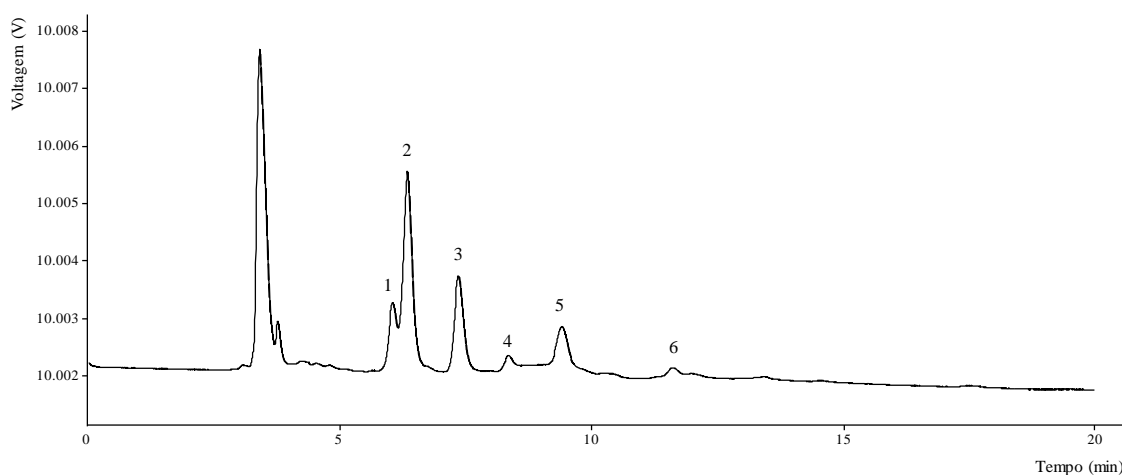


Figura 7 - Perfil em açúcares da amostra de framboesa vermelha. 1: frutose; 2: glucose; 3: sacarose; 4: trealose; 5: melezitose (padrão interno); e 6: rafinose.

Quanto aos ácidos orgânicos (**Tabela 4**), foram detetados o ácido ascórbico, o cítrico e o fumárico (**Figura 8**); destes, o ácido presente em maior quantidade foi o cítrico (2718 ± 134 mg/100 g) e em menor quantidade foi o ácido fumárico ($1,5 \pm 0,1$ mg/100 g). Estes valores vão de encontro ao estudo de Milivojević et al. (2011), no qual, para *Rubus idaeus*, o ácido cítrico é também o ácido orgânico descrito em maior quantidade (mas em proporções muito mais baixas, nomeadamente 15 mg/100 g fw). Além disso, também descrevem a presença de ácido málico (8 mg/100 g fw), o qual não foi detetado na amostra de framboesa vermelha estudada. A acidez dos frutos deve-se à composição em ácidos orgânicos. De acordo com a literatura, as framboesas vermelhas contêm vários ácidos, como o ácido cítrico, o málico, o oxálico e succínico (Stavang et al., 2015).

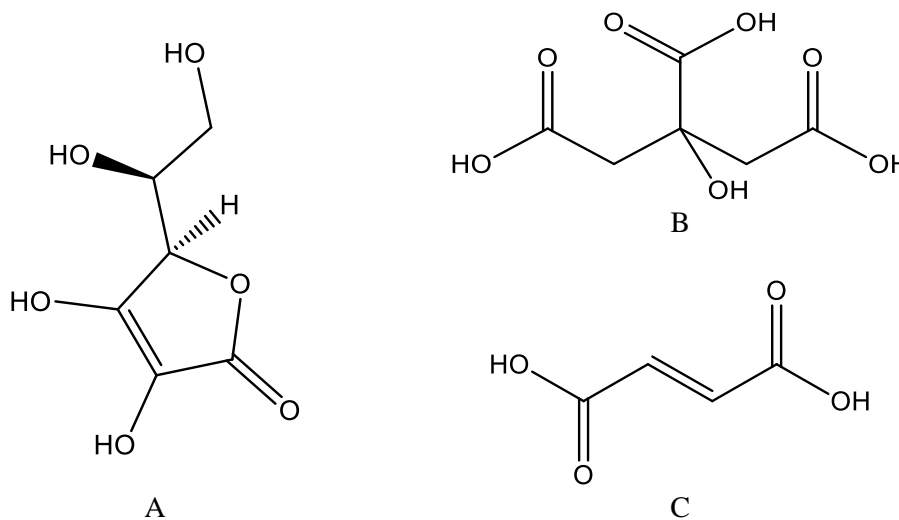


Figura 8 - Estrutura química dos ácidos orgânicos identificados na framboesa vermelha. Ácido ascórbico (A), ácido cítrico (B) e ácido fumárico (C).

A framboesa colhida na primavera pode apresentar teores mais elevados de ácido ascórbico do que os colhidos no inverno, pois existe uma maior disponibilidade de açúcar que é usado como precursor da síntese de ascorbato (forma ionizada do ácido ascórbico). A produção de açúcar pode aumentar se a intensidade da luz for forte, aumentando assim a síntese de ácido ascórbico (Ferreira et al., 2016). Assim, a estação do ano em que se faz a colheita de *Rubus idaeus* pode influenciar o teor de ácido ascórbico (Ferreira et al., 2016), o qual é uma vitamina com elevada capacidade antioxidante.

5.2.2. Ácidos gordos e tocoferóis

A composição da framboesa em ácidos gordos é apresentada na **Tabela 5**. Foram identificados 21 ácidos gordos e os mais abundantes foram os ácidos oleico (C18:1n9c, 27.1%), palmítico (C16:0, 20.2%), α -linolénico (C18:3n3, 16.6%) e linoleico (C18:2n6c, 11.9%). A estrutura química destes compostos lipofílicos é apresentada na **Figura 9**, na qual é possível verificar a presença de insaturações em três destes ácidos gordos.

Tabela 5 - Composição em ácidos gordos da framboesa vermelha.

	Percentagem relativa (%) ¹
Ácido caproico (C6:0)	0,72 ± 0,01
Ácido caprílico (C8:0)	0,32 ± 0,01
Ácido cáprico (C10:0)	0,58 ± 0,01
Ácido undecanoico (C11:0)	1,17 ± 0,02
Ácido láurico (C12:0)	1,11 ± 0,02
Ácido mirístico (C14:0)	1,6 ± 0,02
Ácido pentadecanoico (C15:0)	0,45 ± 0,01
Ácido palmítico (C16:0)	20,2 ± 0,3
Ácido palmitoleico (C16:1)	1,66 ± 0,01
Ácido heptadecanóico (C17:0)	0,452 ± 0,005
Ácido esteárico (C18:0)	6,25 ± 0,09
Ácido oleico (C18:1n9c)	27,1 ± 0,3
Ácido linoleico (C18:2n6c)	11,9 ± 0,3
Ácido α -linolénico (C18:3n3)	16,6 ± 0,3
Ácido araquídico (C20:0)	3,41 ± 0,05
Ácido 11-eicosenoico (C20:1)	0,49 ± 0,02
Ácido eicosanoico (C21:0)	0,35 ± 0,01
Ácido docosanoico (C22:0)	3,48 ± 0,07
Ácido cis-13,16-docosadienóico (C22:2)	0,66 ± 0,02
Ácido tricosanoico (C23:0)	0,46 ± 0,01
Ácido lignocérico (C24:0)	1,17 ± 0,02
Ácidos gordos saturados (SFA)	41,7 ± 0,1
Ácidos gordos monoinsaturados (MUFA)	29,2 ± 0,3
Ácidos gordos polinsaturados (PUFA)	29,1 ± 0,7
Proporção MUFA+PUFA/SFA	0,70 ± 0,02

¹Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão.

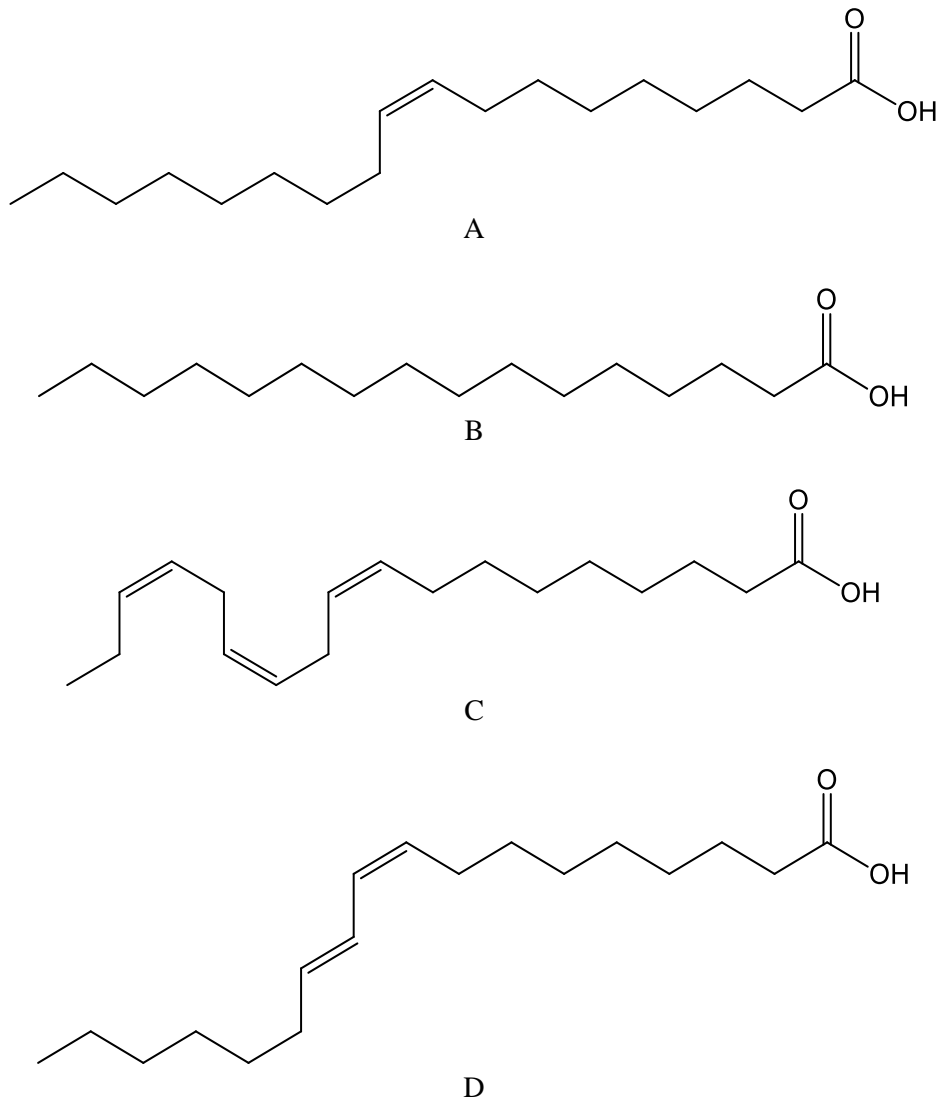


Figura 9 - Estrutura química dos ácidos gordos mais abundantes detetados na framboesa vermelha. Ácido oleico (A), ácido palmítico (B), ácido α -linolénico (C) e ácido linoleico (D).

Os ácidos gordos saturados (SFA) foram detetados em grande quantidade (41.7%), devido aos teores elevados de C16:0 (20.2%), mas também de ácido esteárico (C18:0, 6.25%), araquídico (C20:0, 3.41%) e docosanoico (C22:0, 3.48%) % (**Tabela 5**). Por sua vez, os ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA) foram detetados em igual quantidade (cerca de 29%). Desta forma, é possível concluir que cerca de 58.3% da fração lipídica da framboesa é constituída por ácidos gordos insaturados. Também é interessante destacar que a relação entre PUFA/SFA é um fator avaliativo da qualidade nutricional dos produtos alimentares, sendo que esta relação deve apresentar valores acima de 0,45 (da Silva et al., 2019). Tal como apresentado na **Tabela 5**, esta

relação é de 0,70 no caso da framboesa vermelha estudada, o que destaca a sua qualidade nutricional, apesar de os teores de gordura detetados serem bastante baixos (**Tabela 2**).

De acordo com a plataforma PortFIR (INSA, 2010), a framboesa é constituída por 0 g/100 g de ácidos gordos saturados, 0,1 g/100 g de MUFA e por 0,3 g/100 g de PUFA, considerando que esta contem 0,6 g/100 g fw de gordura. Desta forma, é possível concluir que a fração lípidica é constituída por 17% de MUFA e por 50% de PUFA, diferindo assim dos resultados alcançados para a amostra estudada. Além disso, a mesma tabela composicional apresenta percentagens de cerca de 33% de ácido linoleico, uma percentagem muito superior à descrita no presente estudo (~12%) (**Tabela 5**).

Apesar de os valores acima discutidos serem distintos, Parry et al. (2005) detetou 5 ácidos gordos em amostras de *Rubus idaeus*, os quais também foram detetados no presente estudo. Entre eles encontra-se o ácido palmítico ($1,3 \pm 1,8$ g/100 g), o ácido esteárico ($1,0 \pm 1,4$ g/100 g), o ácido oleico ($12,4 \pm 0,6$ g/100 g), o ácido linoleico ($53,0 \pm 1,9$ g/100 g) e o ácido α -linolénico ($32,4 \pm 0,7$ g/100 g). O presente estudo mostra que os óleos de semente de framboesa vermelha contêm quantidades significativas de ácido α -linolénico (**Figura 9C**), ômega 3 essencial para seres humanos. Assim, pode-se afirmar que a semente de framboesa é uma boa fonte alimentar. Os ácidos gordos essenciais não são sintetizados no corpo humano, por isso, devem ser ingeridos através da dieta (Schulz & Chim, 2019).

Um estudo de Schulz e Chim (2019) descreve o predomínio de ácidos gordos insaturados entre eles o ácido linolénico, linoleico e oleico, com valores de 17,8 a 24,1%, 42,2 a 52,6% e 11,3 a 16,4%, respetivamente. O ácido palmítico variou de 4,9 a 8,3%.

Os resultados da composição em tocoferóis apresentam-se na **Tabela 6**. Tal como apresentado por perfil HPLC da **Figura 10**, foram detetadas três das quatro isoformas, nomeadamente o α -tocoferol, o γ -tocoferol e o δ -tocoferol (**Figura 11**). O δ -tocoferol foi o maioritário (1357 ± 26 μ g/100 g), seguido do γ -tocoferol (515 ± 18 μ g/100 g) e, em menor quantidade, o α -tocoferol (48 ± 1 μ g/100 g). O teor total de tocoferóis na amostra estudada de framboesa foi de 1920 ± 45 μ g/100 g fw.

Parry et al. (2005) reportaram apenas as isoformas α e γ . Por sua vez, Carvalho et al. detetaram γ -tocoferol (5,4–19,7 mg/100 g dw), δ -tocoferol (5,2–14,9 mg/100g dw) e α -tocoferol (0,07–2,1 mg/100 g dw), totalizando um total de tocoferóis de 14–36 mg/100 g de massa seca de *Rubus idaeus*. Estas diferenças no perfil de tocoferóis podem dever-se a variações no genótipo e à influência das condições edafoclimáticas do local onde estas são cultivadas, bem como às práticas agrícolas adotadas.

Tabela 6 - Composição de tocoferóis da framboesa vermelha.

	Conteúdo (fw) ¹
α -Tocoferol ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	48 ± 1
γ -Tocoferol ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	515 ± 18
δ -Tocoferol ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	1357 ± 26
Tocoferóis totais ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	1920 ± 45

¹Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

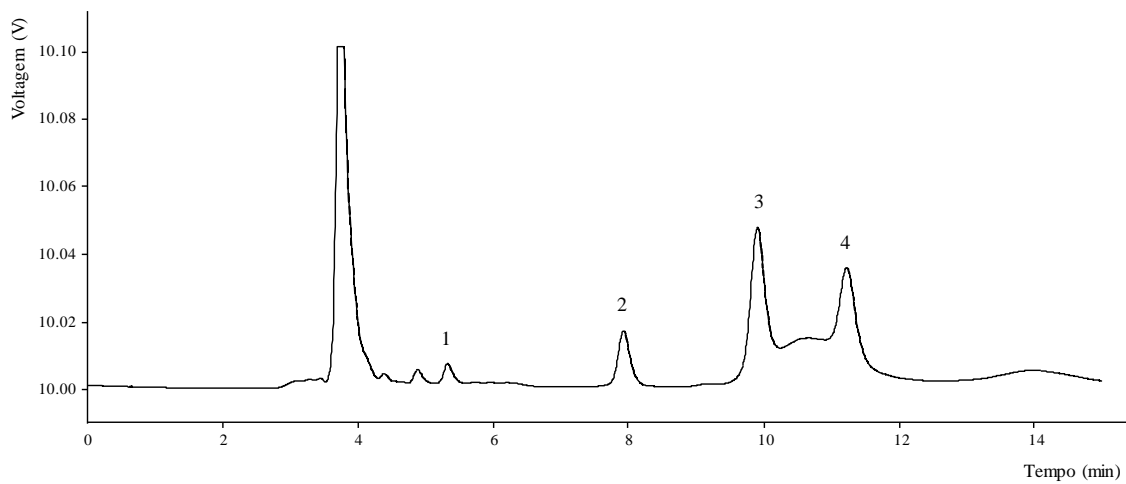


Figura 10 - Perfil em tocoferóis da amostra de framboesa vermelha. 1: α -tocoferol; 2: γ -tocoferol; 3: δ -tocoferol; e 4: tocol (padrão interno).

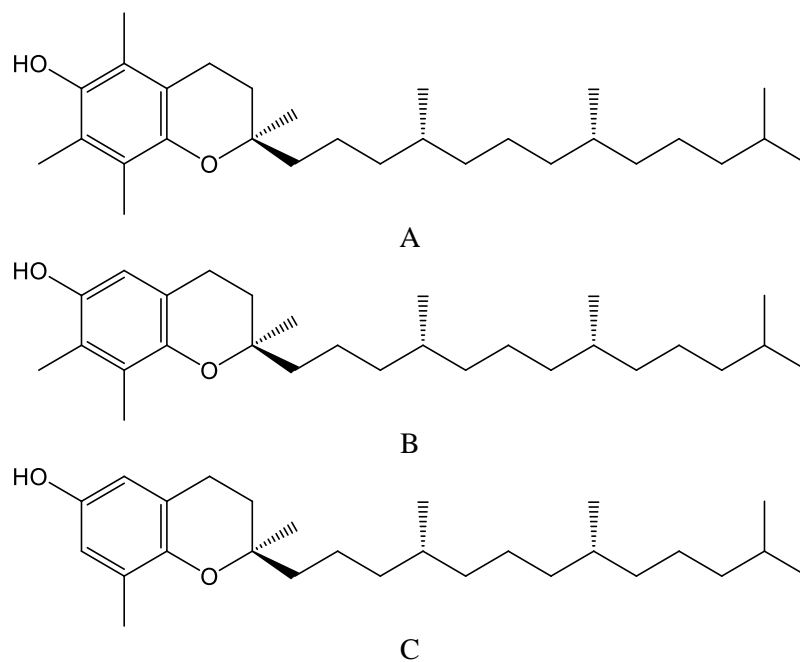


Figura 11 - Estrutura química do α -tocoferol (A), do γ -tocoferol (B) e do δ -tocoferol (C).

5.2.3. Compostos fenólicos não antociânicos e antociânicos

Os resultados da análise de compostos fenólicos no extrato purificado de framboesa são apresentados na **Tabela 6**. Foi identificado um ácido fenólico (cafeoil hexosídeo), um ciclohexanocarboxílico (ácido quinínico) e duas antocianinas (cianidina-*O*-soporósido e cianidina-*O*-hexósido). O perfil em antocianinas é mostrado na **Figura 12**.

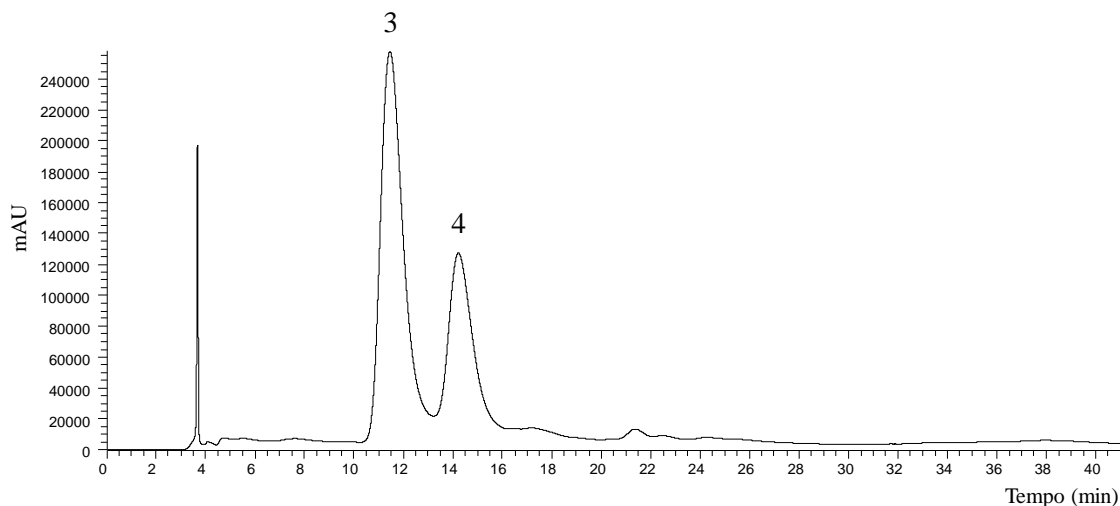


Figura 12 - Perfil em antocianinas do extrato purificado de framboesa vermelha, registrado a 520 nm. 3: cianidina-*O*-soporósido e 4: cianidina-*O*-hexósido.

O composto número 1 apresentou $[M-H]^-$ com uma razão massa/carga (m/z) de 191 e dois fragmentos MS^2 , com um m/z de 173, que corresponde à perda de uma molécula de água, e outro de 111, que corresponde à perda de uma molécula de água e outra de dióxido de carbono, tendo sido identificado como ácido quinínico (**Figura 13A**). Por sua vez, o composto número 2 apresentou um $[M-H]^-$ com m/z de 341 e um fragmento MS^2 com m/z de 161 (ácido cafeico – H⁻), sendo identificado como cafeoil hexosídeo. Relativamente à quantificação, o ácido quinínico predominou sobre cafeína hexosídeo com $144 \pm 9 \mu\text{g/g}$ de extrato versus $2,5 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$ de extrato, respectivamente (**Tabela 6**). O teor total de ácidos fenólicos foi de $147 \pm 9 \mu\text{g/g}$ de extrato.

Relativamente aos compostos antociânicos, o composto número 3 apresentou $[M-H]^+$ com m/z 611 e um fragmento MS^2 com m/z 287, sendo identificado com cianidina-*O*-soporósido. O composto número 4 apresentou um $[M-H]^+$ a m/z 449) e um fragmento m/z de 287, sendo identificado como cianidina-*O*-hexósido (**Figura 13B**). A antocianina maioritária foi a cianidina-*O*-soporósido, com $2.82 \pm 0.03 \text{ mg/g}$ de extrato (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Identificação e quantificação de compostos fenólicos no extrato purificado de framboesa vermelha. É apresentado o tempo de retenção (Tr), o comprimento de onda de absorção máxima na região UV-vis (λ_{\max}), o íon pseudomolecular e os fragmentos MS² (abundância relativa entre parêntesis).

Pico	Tr (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragmentos MS ² (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação
Compostos não antociânicos						($\mu\text{g/g}$ de extrato purificado)
1 ^A	5,47	265	191	173(45), 111(100)	Ácido quínico	144 \pm 9
2 ^B	8,9	282/316	341	161(100)	Cafeoil hexósido	2,5 \pm 0,3
					Total de ácidos fenólicos	147 \pm 9
Pico	Tr (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁺ (m/z)	Fragmentos MS ² (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação
Compostos antociânicos						(mg/g de extrato purificado)
3 ^C	11,48	515	611	287(100)	Cianidina- <i>O</i> -soporósido	2,82 \pm 0,03
4 ^C	14,26	512	449	287(100)	Cianidina- <i>O</i> -hexósido	1,69 \pm 0,02
					Total de antocianinas	4,51 \pm 0,04
					Total de compostos fenólicos	4,66 \pm 0,03

Curvas de calibração usadas na quantificação: A: ácido clorogénico ($y = 168823x - 161172$, $r^2 = 0,9999$); B: ácido cafeico ($y = 388345x + 406.369$, $r^2 = 0,9939$); e C: cianidina-3-*O*-glucósido ($y = 134578x - 3E^{+06}$, $r^2 = 0,9986$).

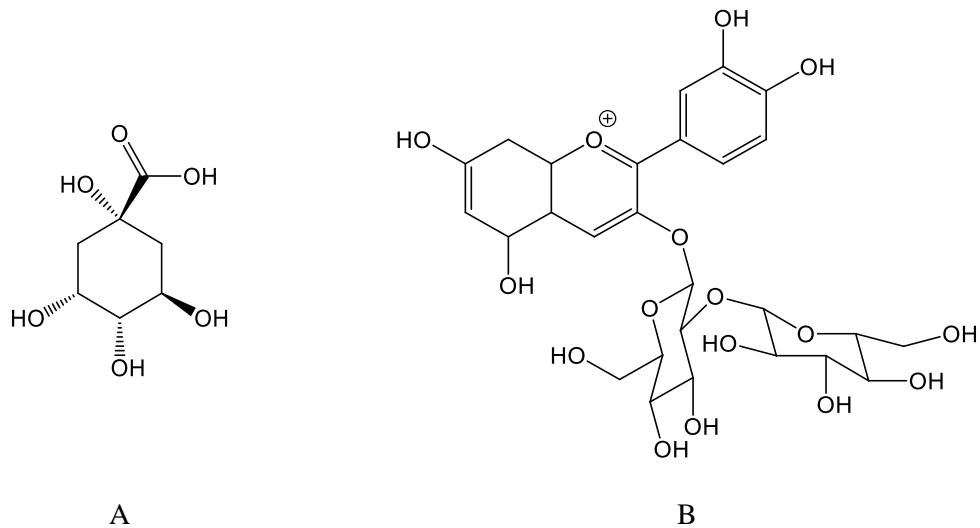


Figura 13 - Estrutura química do ácido quínico (A) e da cianidina-*O*-suforósido (B).

Nas framboesas, as principais antocianinas podem diferir de acordo com a espécie. Por exemplo, Stavang et al. (2015) relatou a presença de cianidina-3-suforósido (41,2-62 mg/100 g fw) e cianidina-3-glucósido (10,1–15,2 mg/100 g fw) em framboesa vermelha (*Rubus idaeus*) e Kula et al. (2016) descreveu a presença de cianidina-3-rutinósido (30,9-250 mg/100 g fw) em framboesa preta (*Rubus occidentalis*). Além disso, Kula e seus colaboradores também verificaram que a framboesa vermelha apresentou maior concentração de catequina, epicatequina e ácido cafeico, enquanto a quercetina e o kaempferol foram mais abundantes na framboesa preta.

Os pequenos frutos como as framboesas e as amoras têm sido apontados como sendo fontes interessantes de compostos fenólicos. Para as framboesas, já foram descritos teores de 500 mg de GAE/100g fw para *Rubus idaeus* e *Rubus occidentalis* (De Souza et al., 2014). No entanto, estes são valores obtidos mediante a utilização de determinações espectrofotométricas, as quais podem estar associadas a uma superestimação.

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários com várias funções nas plantas, incluindo a pigmentação das plantas, atração de polinizadores e proteção contra a radiação UV-Vis excessiva. As antocianinas são pigmentos solúveis em água e proporcionam cores fortes (tons de azul, roxo, vermelho e rosa) aos frutos e às flores, o que permite atrair polinizadores e dispersores de sementes (Chaves-Silva et al., 2018). A cor vermelha da framboesa está relacionada com a sua composição em antocianina. A concentração destes compostos é influenciada por vários fatores, tais como a variedade, a cultivar, o estágio de maturação e as características edafoclimáticas (Lee et al., 2012).

A exposição solar aumenta a concentração de antocianinas, pois promove a expressão de genes biossintéticos de flavonoides na pele dos frutos. Por outro lado, as temperaturas elevadas levam à supressão da biossíntese destes pigmentos (Di Vittori, Mazzoni, Battino, & Mezzetti, 2018).

5.3. Propriedades bioativas *in vitro*

5.3.1. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato de framboesa foi avaliada *in vitro* através de três ensaios distintos que permitem avaliar a capacidade i) de inibir a peroxidação lipídica pela inibição da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), usando tecidos cerebrais de porco como substrato biológico, ii) de impedir a hemólise oxidativa (OxHLIA), usando eritrócitos isolados do sangue de ovelha, e iii) de impedir a descoloração ou branqueamento do β -caroteno. Os resultados são apresentados na **Tabela 7** e expressos em valores de IC_{50} e EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$). Desta forma, quanto menores forem estes valores, maior será a atividade antioxidante do extrato.

Tabela 7 - Atividade antioxidante do extrato de framboesa e dos controlos positivos.

	Extrato de framboesa	Trolox	Valor-p
OxHLIA, $\Delta t = 30$ min (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)	55 ± 1	$8,5 \pm 0,2$	<0,001
OxHLIA, $\Delta t = 60$ min (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)	298 ± 17	19 ± 1	<0,001
TBARS (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)	122 ± 2	$5,4 \pm 0,3$	<0,001
β -CBI (EC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)	$18,7 \pm 0,2$	$0,20 \pm 0,02$	<0,001

No ensaio TBARS, foi obtido um valor de IC_{50} de $122 \pm 2 \mu\text{g/mL}$, muito superior ao do trolox ($5,4 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$) que foi usado como controlo positivo (**Tabela 7**), o que destaca o menor poder antioxidante do extrato de framboesa em relação ao trolox. Este ensaio permitiu avaliar se o extrato produzido consegue evitar a formação de substâncias reativas, tais como o malondialdeído (MDA), que resultam da oxidação de PUFA presentes no material biológico utilizado como substrato, nomeadamente as células de cérebro de porco. Quando o extrato não consegue prevenir a formação de TBARS como o MDA, este vai reagir o ácido tiobarbitúrico (TBA) que é adicionado à mistura antes da

incubação a 80 °C, formando o complexo MDA-TBA2 apresentado na **Figura 14** que apresenta um cor rosa e absorve a um comprimento de onda de 532 nm.

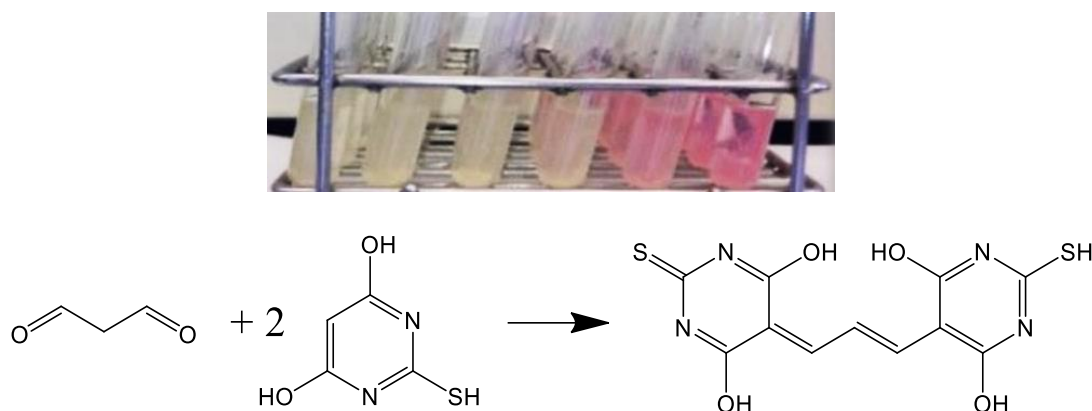


Figura 14 - Estrutura química do complexo MDA-TBA2 formado entre o malondialdeído (MDA) e o ácido tiobarbitúrico (TBA) e tubos de ensaio evidenciando a cor rosa do complexo formado.

No ensaio β -CBI, o extrato de framboesa originou um valor de EC_{50} de $18,7 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$, também superior ao do controlo positivo ($0,20 \pm 0,02$ $\mu\text{g/mL}$) **Tabela 7**. O valor de EC_{50} obtido traduz a quantidade de extrato necessária para inibir em metade a descoloração do β -caroteno, o qual é atacado *in vitro* por radicais linoleato que derivaram da degradação do ácido linoleico adicionado à mistura. A presença de antioxidantes protege desse ataque, mantendo a cor original da solução característica de β -caroteno.

No ensaio OxHLIA, os resultados foram apresentados em valor de IC_{50} a dois Δt diferentes (**Tabela 7**). Estes valores de Δt traduzem o tempo necessário para que uma dada concentração de extrato proteja metade da população de eritrócitos (o chamado Ht_{50}), o qual foi obtido graficamente a partir das curvas de hemólise de cada uma das concentrações de extrato representadas na **Figura 15** e ao qual se descontou o valor do controlo PBS. De seguida, os valores de Δt foram correlacionados com as concentrações do extrato testadas, de modo a calcular a concentração de extrato necessária para retardar a hemólise em 30 e 60 min. Desta forma, verificou-se que são necessárias $55,0 \pm 0,9$ $\mu\text{g/mL}$ e 298 ± 13 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de framboesa para proteger metade dos eritrócitos durante 30 e 60 min, respetivamente (**Tabela 7**). De facto, à medida que o tempo passa, é necessária uma maior concentração de extrato para alcançar um efeito anti-hemolítico. No ensaio, agente oxidante AAPH é o responsável pela formação dos radicais livres *in vitro*, o qual atua progressivamente ao longo do tempo por ação da temperatura. Além disso, os radicais formados no sistema também são detetados no organismo humano, o

que destaca a adequabilidade deste ensaio de base celular para avaliar a atividade antioxidante de extratos naturais.

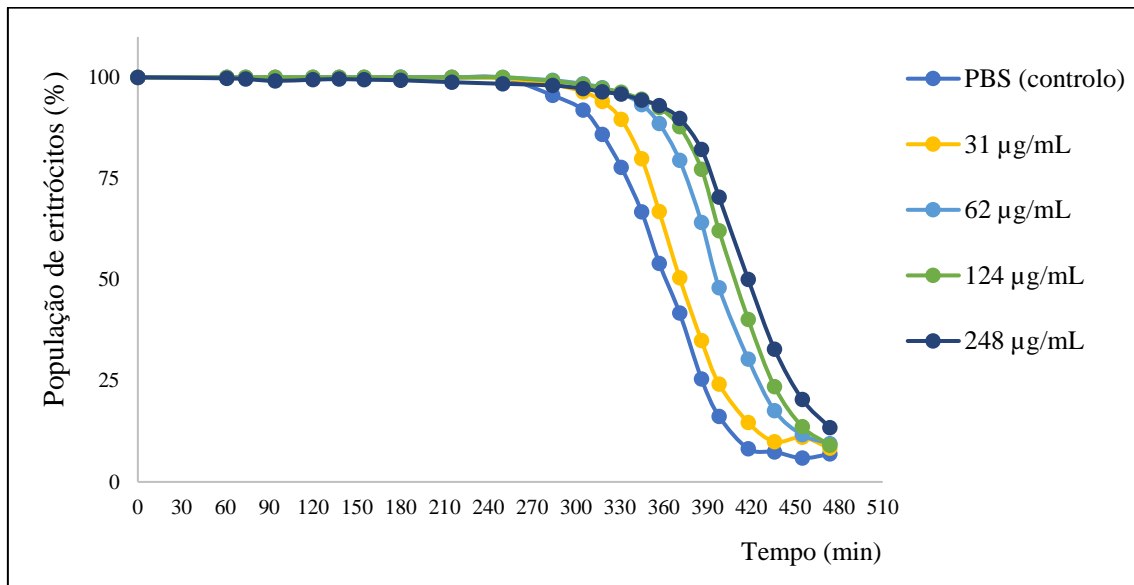


Figura 15 - Curvas de hemólise das diferentes concentrações de extrato de framboesa vermelha e do PBS usado como controle.

Noratto et al. (2017) investigaram os efeitos da ingestão de *Rubus idaeus* (numa dieta isocalórica com 5,3% de framboesa liofilizada, *p/p*) em ratos diabéticos obesos durante oito semanas e observaram uma diminuição no stresse oxidativo medido como oxigénio reativo nos eritrócitos. Segundo os autores, isto explica, pelo menos em parte, que os compostos fenólicos deste fruto vermelho ajudam a desintoxicar o ambiente celular do peróxido de hidrogénio.

Um estudo realizado por Hassimotto et al. (2008) com seres humanos saudáveis evidenciou a relevância dos antioxidantes de *Rubus*. Os resultados sugeriram que a capacidade antioxidante das bagas está associada aos compostos fenólicos, além de outros antioxidantes, como o ácido ascórbico, os carotenoides e vitamina E, também encontrados nestes pequenos frutos.

De acordo com alguns estudos, as bagas de *Rubus*, quando comparadas com outros frutos, também mostraram uma forte capacidade de doar elétrons e átomos de hidrogénio e, por conseguinte, de agir como antioxidantes capazes de reduzir o dano oxidativo causado por diferentes espécies reativas (Zhang et al., 2018).

5.3.2. Atividade antimicrobiana

Os valores das concentrações mínimas inibitórias (CMI) e bactericidas (CMB) ou fungicidas (CMF) obtidas com extrato de framboesa contra as quatro bacteriúrias e os quatro fungos testados, respetivamente, são apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Atividade antibacteriana e antifúngica do extrato de framboesa e controlos positivos.

	Extrato de framboesa		Controlos positivos			
			E211		E224	
Atividade antimicrobiana	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>Bacillus cereus</i>	0,78	1,56	0,5	0,5	2	4
<i>Listeria monocytogenes</i>	3,12	6,24	1	2	0,5	1
<i>Escherichia coli</i>	3,12	6,24	1	2	0,5	1
<i>Salmonella typhimurium</i>	3,12	6,24	1	2	1	1
Atividade antifúngica	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMB
<i>Aspergillus fumigatus</i>	>6,24	>6,24	1	2	1	1
<i>Aspergillus niger</i>	3,12	6,24	1	2	1	1
<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>	>6,24	>6,24	2	4	1	1
<i>Trichoderma viride</i>	1,56	3,12	1	2	0,5	0,5

CMI: concentração mínima inibitória (mg/mL); CMB: concentração mínima bactericida (mg/mL); CMF: concentração mínima fungicida (mg/mL); E211: benzoato de sódio; E224: metabissulfito de potássio.

O estudo evidenciou a atividade antimicrobiana do extrato de framboesa contra todas as estirpes estudadas, com valores de CMI que variaram de 0,78 a 3,12 mg/mL e de CMB de 1,56 a 6,24 mg/mL, para *B. cereus* e as restantes bactérias, respetivamente (**Tabela 8**). Além de *B. cereus* ter sido a bactéria mais suscetível à atividade do extrato de framboesa, este foi mais eficaz do que o metabissulfito de potássio em inibir (2 mg/mL) e matar (4 mg/mL) esta bactéria Gram-positiva.

Krauze-Baranowska et al. (2014) avaliaram as propriedades antimicrobianas de extratos hidroetanólicos de framboesa vermelha (*Rubus idaeus*) e preta (*Rubus occidentalis*) e verificaram que ambos os extratos foram ativos contra todas as bactérias estudadas (15 estirpes), incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A sensibilidade das estirpes bacterianas aos extratos variou bastante e as mais sensíveis foram *Corynebacterium diphtheriae* e *Moraxella catarrhalis*.

Relativamente à atividade antifúngica, as estirpes estudadas apresentaram valores a variar de 1,56 a >6,24 mg/mL (**Tabela 8**). O efeito mais promissor verificou-se contra o fungo *T. viride*, com valores de CMI de 1,56 mg/mL e de CMF de 3,12 mg/mL, ou seja, este foi o fungo mais suscetível ao extrato de framboesa. Seguiu-se o fungo *A. niger*, com uma CMI igual a 3,12 mg/mL e uma CMF de 6,24 mg/mL. Os fungos *A. fumigatus* e *P. verrucosum* var. *cyclopium* apresentam valores iguais de CMI e CMF (>6,24 mg/mL). Os controlos positivos (E211 e E224) apresentaram valores entre 0,50 mg/mL e 4,00 mg/mL.

Também é importante referir que os estudos de atividade antimicrobiana discutidos apresentam limitações associadas à bioacessibilidade dos compostos e se eles serão capazes de atingir os locais de infeção na concentração pretendida.

5.3.3. Atividade anti-inflamatória e citotóxica

Os valores de IC₅₀ que traduzem a capacidade do extrato de framboesa inibir a formação de óxido nítrico numa linha celular de macrófagos de rato (células RAW 264.7) estimuladas com lipopolissacarídeo bacteriano são apresentados na **Tabela 9**. O valor de IC₅₀ obtido foi superior a 400 µg/mL, o que demonstra que o extrato não apresenta capacidade de inibir a produção de óxido nítrico na concentração máxima testada. Desta forma conclui-se que o extrato não apresenta atividade anti-inflamatória.

Tabela 9 - Atividade anti-inflamatória e citotóxica do extrato de framboesa vermelha e controlos positivos.

	Extrato de framboesa	Controlo positivo
Atividade anti-inflamatória (IC ₅₀ , µg/mL)		Dexametasona
RAW 264.7 (macrófagos de rato)	>400	16 ± 1
Atividade citotóxica (GI ₅₀ , µg/mL)		Elipticina
NCI-H460 (carcinoma de pulmão)	>400	1,03 ± 0,09
HeLa (adenocarcinoma cervical)	>400	1,91 ± 0,06
HepG2 (carcinoma hepatocelular)	>400	1,1 ± 0,2
MCF-7 (adenocarcinoma de mama)	>400	1,1 ± 0,2
PLP2 (células primárias de fígado de porco)	>400	3,2 ± 0,7

Os efeitos anti-inflamatórios da framboesa vermelha foram estudados em ratos diabéticos obesos, alimentados com dietas isocalóricas contendo 5,3% (*p/p*) de framboesa

lioofilizada durante 8 semanas. Após medição dos biomarcadores inflamatórios IL-6 e TNF- α , os autores observaram que o grupo alimentado com framboesas apresentou níveis plasmáticos inferiores ao do controle. Estes dados sugeriram que os polifenóis da framboesa podem atuar através de processos de sinalização celular que modulam a produção dessas citocinas (Noratto et al., 2017). Os efeitos anti-inflamatórios da framboesa vermelha também foram avaliados por Jean-Gilles et al. (2012) em ratos com artrite reumatoide induzida por uma suspensão de *Mycobacterium tuberculosis* em esqualeno. Os tornozelos dos animais tratados com 120 mg/kg de extrato de framboesa vermelha foram monitorizados e observou-se que houve a redução de 23% do edema, atenuando a doença, e os animais apresentaram inflamação leve e reabsorção óssea acentuada com danos mínimos de cartilagem.

Mesmo com os diferentes ensaios e concentrações de extratos utilizados, os estudos de atividade anti-inflamatória das framboesas e amoras de *Rubus* mostraram a potencial influência da composição fenólica (elagitaninos, flavonóis, ácidos fenólicos e antocianinas) nos processos inflamatórios. Além disso, quando comparados extratos de frutos imaturos e maduros, os frutos maduros foram mais eficazes que os imaturos, resultado possivelmente associado ao maior teor de polifenóis nos frutos maduros (Bowen-Forbes, Zhang, & Nair, 2010).

A **Tabela 9** apresenta também os resultados da citotoxicidade do extrato de framboesa vermelha para as quatro linhas celulares tumorais humanas e para a cultura primária de células não tumorais testadas. Os resultados foram expressos em função da concentração de extrato responsável por inibir em 50% o crescimento celular, ou seja, valores de GI₅₀. O extrato não induziu citotoxicidade em nenhuma das linhas celulares testadas, tendo sido obtidos valores de IG₅₀ superiores a 400 μ g/mL em todos os casos. Desta forma, foi evidente a ausência de toxicidade para células tumorais e também para as células normais na concentração máxima de extrato testada.

Num estudo anterior, Bowen-Forbes et al. (2010) testou extratos de *Rubus idaeus* obtidos com hexano, metanol e acetato de etilo (a 250 mg/mL) contra várias linhas celulares, nomeadamente MCF-7 (mama), SF-268 (sistema nervoso central), NCI – H460 (pulmão), HCT-116 (cólon) e células tumorais humanas AGS (gástricas). Os extratos de hexano resultaram numa inibição das células cancerígenas da mama e estômago de 17 e 22%, enquanto o crescimento das células cancerígenas do sistema nervoso central foi inibido (14%) apenas pelos extratos de acetato de etilo. Os extratos de metanol não apresentaram atividade na concentração testada. Os autores sugeriram que o efeito

protetor dos extratos de hexano pode estar relacionado com o óleo da semente deste fruto, o qual apresenta uma boa estabilidade à oxidação lipídica.

No estudo de Huang et al. (2016), células cancerígenas orais SCC-9 e SAS foram tratadas com várias concentrações (25–100 µg/mL) de extrato hidroetanólico de *Rubus idaeus* (etanol: água, 50:50, v/v) durante 24 h. A 100 µg/ml, o extrato diminuiu o número de células viáveis de SCC-9 e SAS em 48 e 54%, respectivamente. As percentagens inibitórias para um ensaio de invasão com células SCC-9 e SAS foram de 55 e 79%, respectivamente. O extrato de *Rubus idaeus* também alterou as metástases pela supressão da expressão de metaloproteinases-2 da matriz (MMP-2) através da via de sinalização FAK/Scr/ERK.

As propriedades citotóxicas de *Rubus idaeus* também foram estudadas por Nowak et al. (2017). Os autores mostraram que uma preparação de elagitaninos de framboesa, bem como as principais elagaganinas (sanguíina H-6 e lambertianina C), apresentam uma elevada genotoxicidade contra células Caco-2 de adenocarcinoma de cólon humano. A genotoxicidade aumentou de maneira dependente da dose, mas apenas até uma certa concentração, que foi de 53,4 mol/L para a sanguíina H-6 e 189 mol/L para lambertianina C.

De acordo com estudos científicos, as propriedades quimiopreventivas associadas ao género *Rubus* também estão relacionadas aos compostos antioxidantes, principalmente os polifenóis. A atividade quimiopreventivas destes fitoquímicos pode estar associada à sua capacidade de inativar espécies reativas envolvidas no início e progressão de várias doenças, dada a sua capacidade de diminuir o dano oxidativo ao ADN e promoverem a reparação do mesmo (Nowak et al., 2017). Além disso, as antocianinas presentes na framboesa vermelha desempenham um papel importante na luta contra a lesão oxidativa, podendo servir como agentes quimiopreventivos, o que poderá estar relacionado com a sua estrutura química e grau de glicosilação (Teng et al., 2017).



6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

6.1. Notas de conclusão

A presente dissertação de mestrado consistiu na caracterização nutricional e química da framboesa e na avaliação das suas propriedades bioativas. Relativamente ao valor nutricional, os hidratos de carbono foram os macronutrientes em maior abundância (16,12 g/100 g) a seguir à água. Além disso, apresentou teores reduzidos de gordura e um baixo poder calórico. Quanto aos compostos responsáveis pela doçura e acidez, a amostra estudada apresentou cinco açúcares livres, nomeadamente frutose (o açúcar mais abundante, com 2,42 g/100 g), glucose, sacarose, trealose e rafinose. Também foi possível detetar ácido ascórbico (vitamina C) e, maioritariamente, ácido cítrico (2718 mg/100 g). Por outro lado, foi possível detetar vários compostos de natureza lipofílica, incluindo 21 ácidos gordos, com predominância dos ácidos oleico (27,1%), palmítico (20,2%), α -linolénico (16,6%) e linoleico (11,9%). Os MUFA+PUFA representaram 58,3% da fração lipídica da framboesa, um valor inferior ao encontrado na literatura. Apesar disso, a relação PUFA/SFA foi superior a 0,45, valor estipulado como índice de qualidade dos alimentos. A framboesa também apresentou um teor interessante de tocoferóis (1920 μ g/100 g), com predominância de δ -tocoferol (1357 μ g/100 g), seguido das isoformas γ - e α -.

Os extratos hidroetanólicos de framboesa apresentaram dois ácidos fenólicos (nomeadamente ácido quinico e cafeoil-hexósido) e duas antocianinas (a cianidina-*O*-suforósido e a cianidina-*O*-hexósido), as quais foram detetadas em maior quantidade e serão as responsáveis pela cor vermelha da framboesa. A atividade antioxidante foi testada *in vitro* através de três ensaios distintos que permitiram avaliar a capacidade de inibir a peroxidação lipídica, a hemólise oxidativa e a descoloração do β -caroteno; apesar dos valores de EC_{50} e IC_{50} obtidos serem superiores ao do trolox, é importante referir que o trolox é um composto puro, enquanto os extratos são uma mistura complexa de vários compostos, alguns dos quais não contribuem para a atividade antioxidante. Para a atividade antimicrobiana, o extrato de framboesa apresentou efeito bactericida e fungicida contra as estirpes testadas, com alguns resultados comparáveis aos dos controlos positivos testados. Por outro lado, o extrato não apresentou citotoxicidade para as quatro linhas tumorais humanas e não tumoral testadas na concentração máxima testada, com valores de GI_{50} superiores a 400 μ g/mL. Também não revelou capacidade de inibir a produção de NO pela linha celular RAW 264.7 estimulada com lipopolissacarídeo bacteriano.

Também é possível concluir que a framboesa vermelha é uma boa alternativa para enriquecer e incluir na dieta diária, pois é equilibrada do ponto de vista nutricional e rica

em antioxidantes naturais. Além disso, os bio-resíduos deste pequeno fruto poderão ser usados na produção de corantes naturais devido à sua composição em antocianinas. Também poderão ser usados para produzir extratos bioativos de interesse para a formulação de nutracêuticos e alimentos funcionais, pois foi demonstrada a sua atividade antioxidante e antimicrobiana e a ausência de citotoxicidade dos extratos.

Todos os objetivos propostos para esta dissertação de mestrado foram alcançados e os resultados são relevantes, não só para a comunidade científica como também para o consumidor em geral e produtores de framboesa. Além disso, os resultados poderão vir a ser utilizados para atualizar as tabelas de composição nutricional da PortFIR - Plataforma Portuguesa de Informação Alimentar relativas à framboesa vermelha.

6.2. Perspetivas futuras

Em trabalhos futuros seria interessante otimizar métodos de extração e purificação sustentáveis e viáveis para obter extratos ricos em antocianinas com potencial corante a partir de bio-resíduos de framboesa. Estes poderiam ser posteriormente incorporados num alimento para avaliar e comprovar o seu potencial corante e também conservante (devido às propriedades antioxidante e antimicrobianas). Também seria importante fazer estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade e avaliar a eficácia dos principais compostos da framboesa enquanto agentes quimiopreventivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, R. M. V, Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., & Lima, R. T. (2011). *Anti-hepatocellular carcinoma activity using cells and carboxylate derivatives : in vitro evaluation , cell cycle analysis and QSAR studies*. 1–26.
- Ahmad, M., Masood, S., Sultana, S., Hadda, T. Ben, Bader, A., & Zafar, M. (2015). Antioxidant and nutraceutical value of wild medicinal Rubus berries. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(1), 241–247.
- AOAC International. (2016). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (20th ed.; G. W. Latimer, ed.). Gaithersburg: AOAC International.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436.
- Barreiro, M. F., Martins, A., González-Paramás, A. M., Ferreira, I. C. F. R., & Taofiq, O. (2016). Mushrooms extracts and compounds in cosmetics, cosmeceuticals and nutricosmetics—A review. *Industrial Crops and Products*, 90, 38–48.
- Barros, L., Dueñas, M., Pinela, J., Carvalho, A. M., Buelga, C. S., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Characterization and quantification of phenolic compounds in four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmers' varieties in Northeastern Portugal homegardens. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(3), 229–234.
- Barros, L., Pereira, E., Calhelha, R. C., Carvalho, A. M., Santos-buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1732–1740.
- Bobinaité, R., Viškelis, P., & Venskutonis, P. R. (2012). Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars. *Food Chemistry*, 132(3), 1495–1501.
- Bowen-Forbes, C. S., Zhang, Y., & Nair, M. G. (2010). Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 554–560.
- Burton-Freeman, B. M., Sandhu, A. K., & Edirisinghe, I. (2016). Red raspberries and their bioactive polyphenols: Cardiometabolic and neuronal health links. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 7(1), 44–65.

- Cao, G., Muccitelli, H. U., Sánchez-Moreno, C., & Prior, R. L. (2001). Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: A pharmacokinetic study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(5), 920–926.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51(1), 15–25.
- Carvalho, E., Fraser, P. D., & Martens, S. (2013). Carotenoids and tocopherols in yellow and red raspberries. *Food Chemistry*, 139(1–4), 744–752.
- Četojević-Simin, D. D., Velićanski, A. S., Cvetković, D. D., Markov, S. L., Četković, G. S., Tumbas Šaponjac, V. T., ... Djilas, S. M. (2015). Bioactivity of Meeker and Willamette raspberry (*Rubus idaeus* L.) pomace extracts. *Food Chemistry*, 166, 407–413.
- Chaves-Silva, S., Santos, A. L. dos, Chalfun-Júnior, A., Zhao, J., Peres, L. E. P., & Benedito, V. A. (2018). Understanding the genetic regulation of anthocyanin biosynthesis in plants – Tools for breeding purple varieties of fruits and vegetables. *Phytochemistry*, 153, 11–27.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560.
- Corrêa, R. C. G., de Souza, A. H. P., Calhelha, R. C., Barros, L., Glamoclija, J., Sokovic, M., ... Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactive formulations prepared from fruiting bodies and submerged culture mycelia of the Brazilian edible mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* Singer. *Food & Function*, 6(7), 2155–2164.
- da Silva, L. P., Pereira, E., Pires, T. C. S. P., Alves, M. J., Pereira, O. R., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). *Rubus ulmifolius* Schott fruits: A detailed study of its nutritional, chemical and bioactive properties. *Food Research International*, 119, 34–43.
- Das, Q., Islam, M. R., Marcone, M. F., Warriner, K., & Diarra, M. S. (2017). Potential of berry extracts to control foodborne pathogens. *Food Control*, 73, 650–662.
- De Ancos, B., Gonzalez, E. M., & Cano, M. P. (2000). Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10),

- 4565–4570.
- De Souza, V. R., Pereira, P. A. P., Da Silva, T. L. T., De Oliveira Lima, L. C., Pio, R., & Queiroz, F. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, *156*, 362–368.
- Detalhe Alimento. (2010). Consultado a 1 de fevereiro de 2019, no website do Instituto Nacional de Saúde: <http://www2.insa.pt/SITES/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetalheAlimento.aspx?ID=IS653>
- Di Vittori, L., Mazzoni, L., Battino, M., & Mezzetti, B. (2018). Pre-harvest factors influencing the quality of berries. *Scientia Horticulturae*, *233*(July 2017), 310–322.
- Faniadis, D., Drogoudi, P. D., & Vasilakakis, M. (2010). Effects of cultivar, orchard elevation, and storage on fruit quality characters of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Scientia Horticulturae*, *125*(3), 301–304.
- FAOSTAT. (2020). FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/>
- Ferreira, R., Sellés, G., Saavedra, J., Ortiz, J., Zúñiga, C., Troncoso, C., ... Defilippi, B. G. (2016). Identification of pre-harvest factors that affect fatty acid profiles of avocado fruit (*Persea americana* Mill) cv. “Hass” at harvest. *South African Journal of Botany*, *104*, 15–20.
- Gülçin, I., Topal, F., Çakmakçi, R., Bilsel, M., Gören, A. C., & Erdogan, U. (2011). Pomological Features, nutritional quality, polyphenol content analysis, and antioxidant properties of domesticated and 3 wild ecotype forms of raspberries (*Rubus idaeus* L.). *Journal of Food Science*, *76*(4), 585–593.
- Hassimotto, N. M. A., Pinto, M. D. S., & Lajolo, F. M. (2008). Antioxidant status in humans after consumption of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) juices with and without defatted milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(24), 11727–11733.
- Huang, Y.-W., Chuang, C.-Y., Hsieh, Y.-S., Chen, P.-N., Yang, S.-F., Shih-Hsuan-Lin, ... Chang, Y.-C. (2016). *Rubus Idaeus* extract suppresses migration and invasion of human oral cancer by inhibiting MMP-2 through modulation of the Erk1/2 signaling pathway. *Environmental Toxicology*, *32*(3), 1037-1046.
- INSA. (2010). PortFIR - Plataforma Portuguesa de Informação Alimentar. <http://portfir.insa.pt/>

- Jean-Gilles, D., Li, L., Ma, H., Yuan, T., Chichester, C. O., & Seeram, N. P. (2012). Anti-inflammatory effects of polyphenolic-enriched red raspberry extract in an antigen-induced arthritis rat model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(23), 5755–5762.
- Kafkas, E., Koşar, M., Türemiş, N., & Başer, K. H. C. (2006). Analysis of sugars, organic acids and vitamin C contents of blackberry genotypes from Turkey. *Food Chemistry*, *97*(4), 732–736.
- Kirakosyan, A., Seymour, E. M., Kondoleon, N., Gutierrez, E., Wolforth, J., & Bolling, S. (2018). The intake of red raspberry fruit is inversely related to cardiac risk factors associated with metabolic syndrome. *Journal of Functional Foods*, *41*, 83–89.
- Krauze-Baranowska, M., Majdan, M., Hałas, R., Głód, D., Kula, M., Fecka, I., & Orzeł, A. (2014). The antimicrobial activity of fruits from some cultivar varieties of *Rubus idaeus* and *Rubus occidentalis*. *Food and Function*, *5*(10), 2536–2541.
- Kula, M., Majdan, M., Głód, D., & Krauze-Baranowska, M. (2016). Phenolic composition of fruits from different cultivars of red and black raspberries grown in Poland. *Journal of Food Composition and Analysis*, *52*, 74–82.
- Lee, J., Dossett, M., & Finn, C. E. (2012). Rubus fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing. *Food Chemistry*, *130*(4), 785–796.
- Liisa.J., N., Hanna.-Leena., A., Marja.P., K., Marina., H., Ilkka.M., H., Kirsi.-M., O.-C., & Riitta.H., P.-P. (2006). Berry phenolics: Antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and Cancer*, *54*(1), 18–32.
- Lockowandt, L., Pinela, J., Roriz, C. L., Pereira, C., Abreu, R. M. V., Calhelha, R. C., ... Ferreira, I. C. F. R. (2019). Chemical features and bioactivities of cornflower (*Centaurea cyanus* L.) capitula: The blue flowers and the unexplored non-edible part. *Industrial Crops and Products*, *128*, 496–503.
- Martins, N., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends in Food Science & Technology*, *48*, 1–12.
- Mditshwa, A., Magwaza, L. S., Tesfay, S. Z., & Mbili, N. (2017). Postharvest quality and composition of organically and conventionally produced fruits: A review. *Scientia Horticulturae*, *216*, 148–159.
- Milivojević, J., Maksimović, V., Nikolić, M., Bogdanović, J., Maletić, R., & Milatović, D. (2011). Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild *Fragaria* and *Rubus* berries. *Journal of Food Quality*, *34*(1), 1–9.

- Noratto, G. D., Chew, B. P., & Atienza, L. M. (2017). Red raspberry (*Rubus idaeus* L.) intake decreases oxidative stress in obese diabetic (db/db) mice. *Food Chemistry*, 227, 305–314.
- Nowak, A., Sójka, M., Klewicka, E., Lipińska, L., Klewicki, R., & Kołodziejczyk, K. (2017). Ellagitannins from *Rubus idaeus* L. exert geno- and cytotoxic effects against human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(14), 2947–2955.
- Oliveira, P. B. (2007). *A planta de framboesa Morfologia e fisiologia*. Retirado de http://www.iniav.pt/fotos/gca/1_a_planta_de_framboesa_morfologia_e_fisiologia_1369128264.pdf
- Parry, J., Su, L., Luther, M., Zhou, K., Peter Yurawecz, M., Whittaker, P., & Yu, L. (2005). Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry, and blueberry seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 566–573.
- Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Nutritional composition and antioxidant activity of four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmer' varieties in Northeastern Portugal homegardens. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3–4), 829–834.
- Rao, A. V., & Snyder, D. M. (2010). Raspberries and human health: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 3871–3883.
- Reis, F. S., Martins, A., Vasconcelos, M. H., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. *Trends in Food Science and Technology*, 66, 48–62.
- Schulz, M., & Chim, J. F. (2019). Nutritional and bioactive value of Rubus berries. *Food Bioscience*, 31(July), 100438.
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H. S., & Heber, D. (2006). Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25), 9329–9339.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820–897.
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., & Sochor, J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International*

- Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 24673–24706.
- Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., & Griensven, L. J. L. D. van. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*, 15(11), 7532–7546.
- Sousa, M. B. (2007). *Framboesa Qualidade pós-colheita*. Retirado de http://www.iniaiv.pt/fotos/gca/6_framboesa_qualidade_pos_colheita_1369136880.pdf
- Stavang, J. A., Freitag, S., Foito, A., Verrall, S., Heide, O. M., Stewart, D., & Sønsteby, A. (2015). Raspberry fruit quality changes during ripening and storage as assessed by colour, sensory evaluation and chemical analyses. *Scientia Horticulturae*, 195, 216–225.
- Szymanowska, U., Baraniak, B., & Bogucka-Kocka, A. (2018). Antioxidant, anti-inflammatory, and postulated cytotoxic activity of phenolic and anthocyanin-rich fractions from polana raspberry (*Rubus idaeus* L.) fruit and juice-*in vitro* study. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(7), 1–17.
- Teng, H., Fang, T., Lin, Q., Song, H., Liu, B., & Chen, L. (2017). Red raspberry and its anthocyanins: Bioactivity beyond antioxidant capacity. *Trends in Food Science and Technology*, 66, 153–165.
- Tosun, M., Ercisli, S., Karlidag, H., & Sengul, M. (2009). Characterization of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes for their physicochemical properties. *Journal of Food Science*, 74(7), C575-C579.
- Trivedi, A. K., Verma, S. K., & Tyagi, R. K. (2016). Variability in morpho-physiological traits and antioxidant potential of *Rubus* species in Central Himalayan Region. *Industrial Crops and Products*, 82, 1–8.
- Van Hoed, V., De Clercq, N., Echim, C., Andjelkovic, M., Leber, E., Dewettinck, K., & VerhÉ, R. (2009). Berry seeds: A source of specialty oils with high content of bioactives and nutritional value. *Journal of Food Lipids*, 16(1), 33–49.
- Vattem, D. A., Lin, Y. T., Labbe, R. G., & Shetty, K. (2004). Antimicrobial activity against select food-borne pathogens by phenolic antioxidants enriched in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using the food grade fungus *Rhizopus oligosporus*. *Process Biochemistry*, 39(12), 1939–1946.
- Vaz, J. A., Heleno, S. A., Martins, A., Almeida, G. M., Vasconcelos, M. H., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). Wild mushrooms *Clitocybe alexandri* and *Lepista inversa*: In vitro antioxidant activity and growth inhibition of human tumour cell lines. *Food and*

- Chemical Toxicology*, 48(10), 2881–2884.
- Veljkovic, B., Dordevic, N., Dolicanin, Z., Licina, B., Topuzovic, M., Stankovic, M., ... Dajic-Stevanovic, Z. (2018). Antioxidant and anticancer properties of leaf and fruit extracts of the wild raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(1), 359–367.
- Vuong, Q. V., Hirun, S., Phillips, P. A., Chuen, T. L. K., Bowyer, M. C., Goldsmith, C. D., & Scarlett, C. J. (2014). Fruit-derived phenolic compounds and pancreatic cancer: Perspectives from Australian native fruits. *Journal of Ethnopharmacology*, 152(2), 227–242.
- Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), 701–705.
- Zengin, G., Mahomoodally, M. F., Aktumsek, A., Ceylan, R., Uysal, S., Mocan, A., ... Soković, M. (2018). Functional constituents of six wild edible *Silene* species: A focus on their phytochemical profiles and bioactive properties. *Food Bioscience*, 23(March), 75–82.
- Zengin, G., Uysal, A., Aktumsek, A., Mocan, A., Mollica, A., Locatelli, M., ... Mahomoodally, M. F. (2017). *Euphorbia denticulata* Lam.: A promising source of phyto-pharmaceuticals for the development of novel functional formulations. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 87, 27–36.
- Zhang, X., Sandhu, A., Edirisinghe, I., & Burton-Freeman, B. (2018). An exploratory study of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) (poly)phenols/metabolites in human biological samples. *Food and Function*, 9(2), 806–818.
- Zhu, Z., Wu, Q., Di, X., Li, S., Barba, F. J., Koubaa, M., ... He, J. (2017). Multistage recovery process of seaweed pigments: Investigation of ultrasound assisted extraction and ultra-filtration performances. *Food and Bioproducts Processing*, 104, 40–47.