

# **Caracterização de *Arbutus unedo* L.: estudo da maturação dos frutos na composição química e atividade antioxidante**

**Maria João Teixeira Alves**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança  
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança  
Alimentar*

Orientado por

**Professor Doutor José Alberto Pereira**

**Professora Doutora Paula Baptista**

**Bragança  
2012**



Trabalho desenvolvido no Laboratório  
de Agrobiotecnologia, Departamento de  
Produção e Tecnologia Vegetal da Escola  
Superior Agrária de Bragança

*Aos meus Pais*

&

*Aos meus avós*

III



## **Agradecimentos**

Ao concluir mais uma etapa não poderia deixar de agradecer a todos aqueles, que de uma forma ou outra, contribuíram para que chegasse ao fim de mais um ciclo.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Professor Doutor José Alberto Pereira, da Escola Superior Agrária, por me ter apresentado e orientado o trabalho ao longo de toda a sua realização, bem como pelo incentivo, disponibilidade, amizade e paciência demonstradas ao longo de todo o percurso.

À Professora Doutora Paula Cristina dos Santos Baptista, da Escola Superior Agrária, por todo o auxílio prestado, pela constante presença, preocupação, disponibilidade e pelas sugestões e críticas que permitiram melhorar este trabalho.

À Professora Doutora Susana Casal, do Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pelas facilidades concedidas para a determinação dos ácidos gordos, Vitamina E e antocianinas, bem como toda a disponibilidade e conhecimentos transmitidos.

Ao Professor Doutor Albino Bento, da Escola Superior Agrária, pela simpatia e esforço de forma a garantir condições materiais e financeiras para o bom desenvolvimento do trabalho.

Ao Ricardo e ao Ivo, por toda a disponibilidade e ajuda prestadas ao longo de toda a realização do trabalho, tanto pela transmissão de conhecimentos, como pelo incentivo constante. À Rebeca, que apesar do pouco tempo que trabalhámos juntas, a sua ajuda e amizade foram indispensáveis para a concretização deste trabalho.

A todos os colegas e as funcionárias do Laboratório de Agrobiotecnologia, pelo bom ambiente de trabalho proporcionado, pela boa disposição, paciência e ajuda constante na realização da parte experimental deste trabalho.

A todos os meus amigos, Candy, Mika, Dânia, às pessoas da associação e ao Filipe que me incentivaram, divertiram e apoiaram, pela amizade e carinho demonstrado ao longo destes anos.

Por fim agradecer à minha família em particular à minha irmã, pelo apoio e amor demonstrados, foram sempre incansáveis.

A todos um muito obrigada!

Trabalho financiado em parte pelo Projecto **"AGRINDIF-Mejora de la competitividad del sector agrario de Castilla y León y Norte de Portugal através de la innovación y el desarrollo de productos diferenciados de alto valor"** financiado pelo POCTEP – Programa Operacional de Cooperação Transfronteiriça Espanha - Portugal.

# Índice

<b>RESUMO .....</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XII</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>XIV</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>XV</b>
<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO/OBJETIVOS</b>	
<b>1.1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
1.2. Importância do medronheiro .....	3
1.3. Composição química dos frutos e folhas de medronheiro .....	5
1.3.1. <i>FRUTOS</i> .....	5
1.3.2. <i>FOLHAS</i> .....	8
1.4. Enquadramento e objetivos do trabalho .....	10
<b>CAPÍTULO 2 - ATIVIDADE BIOLÓGICA DE DIFERENTES PARTES DE</b>	
<b><i>Arbutus unedo</i> L.</b>	
<b>2.1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
2.2.1. Amostras.....	15
2.2.2 Reagentes.....	15
2.2.3 Preparação dos Extratos .....	15
2.2.4 Atividade Antioxidante .....	16
2.2.4.1. <i>CAPACIDADE REDUTORA TOTAL PELO MÉTODO FOLIN-CIOCALTEAU..</i>	<i>16</i>
2.2.4.2 <i>EFEITO BLOQUEADOR DOS RADICAIS LIVRES 2,2-DIFENIL-1-</i>	
<i>PICRIHIDRAZIL (DPPH) .....</i>	<i>16</i>
2.2.4.3 <i>PODER REDUTOR.....</i>	<i>17</i>
2.2.5. Análise estatística .....	17
<b>2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2.4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>24</b>

**CAPÍTULO 3 - EFEITO DA MATURAÇÃO DOS FRUTOS DE *Arbutus unedo* L. NA SUA COMPOSIÇÃO**

<b>3.1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.2.1. Amostras.....	28
3.2.2. Reagentes.....	28
3.2.3. Padrões .....	29
3.2.4. Humidade .....	29
3.2.5. Proteína.....	29
3.2.6. Cinzas .....	29
3.2.7. Hidratos de carbono e valor energético .....	30
3.2.8. Ácidos Gordos .....	30
<i>DERIVATIZAÇÃO A QUENTE (ÁCIDOS GORDOS):</i> .....	30
3.2.9. Vitamina E.....	31
<i>CURVA PADRÃO DE TOCOFERÓIS:</i> .....	31
3.2.10. Cor.....	32
3.2.10. Carotenóides.....	32
3.2.11. Antocianinas .....	32
<i>QUANTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS</i> .....	33
3.2.12. Atividade antioxidante .....	33
3.2.13. Análise estatística .....	33
<b>3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
3.3.1 Avaliação nutricional .....	35
3.3.2 Ácidos gordos.....	37
3.3.3. Vitamina E.....	41
3.3.4. Cor.....	43
3.3.5. $\beta$ -caroteno.....	44
3.3.6. Antocianinas .....	45
3.3.7. Atividade antioxidante .....	47
<b>3.4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>51</b>

**CAPÍTULO 4 - CONCLUSÕES GERAIS**

<b>4.1. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>55</b>
<b>CAPÍTULO 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>59</b>

## Resumo

A espécie *Arbutus unedo* L., vulgarmente conhecida como medronheiro, é uma árvore de pequenas dimensões que surge dispersa em todo o território nacional. Vários usos tradicionais, sobretudo no âmbito medicinal e alimentar, têm sido citados para os seus frutos (medronho), folhas e raízes. Contudo, a sua potencialidade neste âmbito não tem sido devidamente explorado, o que tem contribuído para a redução da área ocupada por esta espécie nos povoamentos florestais.

O presente trabalho teve como principal objetivo complementar os conhecimentos sobre os usos tradicionais do medronheiro, pela exploração do seu potencial nutricional e nutracêutico, de maneira a utilizá-los em processos de desenvolvimento tecnológico valorizando-se, desta forma, a espécie. Para tal, foi avaliada a atividade antioxidante das folhas, frutos e, pela primeira vez, das cascas e das flores do medronheiro. Nesta análise recorreu-se a três ensaios: efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-Difenil-1-picrihidrazilo (DPPH), poder redutor e capacidade redutora total. Nos frutos avaliou-se, adicionalmente, a sua cor e a composição nutricional e nutracêutica, bem como a influência do estado de maturação nestes parâmetros. A análise nutricional incluiu a avaliação da humidade, proteína, cinzas, hidratos de carbono, valor energético e o perfil em ácidos gordos por GC-FID. A composição nutracêutica incluiu a análise de vitamina E e o perfil em antocianinas por HPLC-DAD e  $\beta$ -caroteno por espectrometria.

As cascas exibiram o maior poder antioxidante, apresentando valores de  $Ec_{50}$  para o DPPH de  $(0,11 \pm 0,01 \text{ mg extrato/mL})$ ,  $Ec_{50}$  para o poder redutor de  $(0,32 \pm 0,01 \text{ mg extrato/mL})$  e capacidade redutora total  $(158,93 \pm 6,71 \text{ mg GAE/ g de extracto})$  significativamente superiores face às restantes partes do medronheiro estudadas. Por oposição, os frutos exibiram o menor poder antioxidante. A análise química dos frutos indicou que são ricos em ácidos gordos  $\omega$ -3 (tendo sido o ácido  $\alpha$ -linolénico o maioritário e a variar entre 41,6 e 49,7%) e pobres em gorduras saturadas (SFA). Apresentam ainda quantidades interessantes de fenóis, vitamina E (em especial de  $\alpha$ -tocoferol), antocianinas (em especial cianidina-3-galactosídeo) e  $\beta$ -caroteno. O teor destes compostos nos frutos variou de acordo com o seu estado de maturação, apresentando os frutos maduros menor teor em ácidos gordos e compostos antioxidantes (fenóis, vitamina E e  $\beta$ -caroteno), e maior teor em hidratos de carbono. Pelo contrário, foram os frutos verdes que exibiram uma maior capacidade antioxidante registando-se,

para a capacidade redutora total valores de  $113,37 \pm 5,78$  mg GAE/g extracto, e valores de  $EC_{50}$  para o DPPH e poder redutor de  $0,18 \pm 0,02$  mg extrato/mL e  $0,47 \pm 0,04$  mg extrato/mL, respectivamente.

As propriedades demonstradas pelas diferentes partes do medronheiro podem abrir novas perspectivas para o seu uso medicinal, farmacêutico e alimentar e, deste modo, para a valorização económica desta espécie.

**Palavras-chave:** *Arbutus unedo* L., atividade antioxidante, folhas, frutos, casca, flores.

## Abstract

The *Arbutus unedo* L., typically known as strawberry-tree is a small shrub mainly distributed throughout the entire Portuguese territory. Many traditional uses, especially within medicine and food, have been cited for their fruit (arbutus), leaves and roots. However, its potential in this area has not been adequately explored, which has contributed to the reduction of the area occupied by this species in forest stands.

The aim of this work was to complement the knowledge about traditional uses of arbutus, by exploiting its potential nutritional and nutraceutical in order to use them in processes of technological development adding value to the specie. To this end, we evaluated the antioxidant activity of the leaves, fruits, and for the first time, the bark and flowers of the strawberry tree. In this analysis we applied three methods: scavenging effect on DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radicals, reducing power and total reducing capacity. In the fruits, the content in moisture, protein, ashes, carbohydrates, energy value, fatty acids (GC-FID) was performed. Nutraceutical composition included vitamin E analysis, anthocyanin by HPLC-DAD and  $\beta$ -carotene by spectrometry.

The barks revealed the highest antioxidant power, obtaining DPPH values ( $0,11 \pm 0,01$  mg extract/mL), reducing power ( $0,32 \pm 0,01$  mg extract/mL) and total reducing capacity ( $158,93 \pm 6,71$  mg GAE/ g of extract) higher compared to all others parts. On the other hand, the fruits have revealed the minor antioxidant content. Chemical analysis on fruits determined that these have high content in omega-3 fatty acids ( $\alpha$ -linolenic represented the majority content with 41,6 and 49,7 %) and low content in saturated fats (SFA). Interesting values on the content of total phenols, Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol), anthocyanin (cyanidin-3-galactoside) and  $\beta$ -carotene. The composition and content of these compounds in fruits, varied according to its state of maturation, presenting mature fruits, low fatty acid content and antioxidant compounds (phenols, vitamin E and  $\beta$  carotene) and higher content of carbohydrates. On the other hand, green fruits exhibited a higher antioxidant capacity, registering for the total reduction capacity values of  $113.37 \pm 5.78$  mg GAE / g extract, and  $EC_{50}$  values for DPPH and reducing power of  $0,18 \pm 0.02$  mg extract / mL and  $0.47 \pm 0.04$  mg extract / mL, respectively.

The properties shown by different parts of arbutus can open new prospects for medical, pharmaceutical and food purpose and thus for the economic recovery of this species.

**Key-words:** *Arbutus unedo* L., antioxidant activity, leaves, fruits, barks, flowers.

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> Composição química de frutos de <i>A. unedo</i> . ....	6
<b>Tabela 2</b> Rendimento de extração (média $\pm$ desvio padrão) e capacidade redutora total de <i>Arbutus unedo</i> L. (cascas, folhas, flores e frutos).....	19
<b>Tabela 3</b> Valores de EC <sub>50</sub> para DPPH e Poder redutor expressos em mg de extrato/mL (média $\pm$ desvio padrão) de diferentes partes de <i>Arbutus unedo</i> L. (cascas, folhas, flores e frutos).....	22
<b>Tabela 4</b> Composição nutricional de frutos de <i>Arbutus unedo</i> L. (média $\pm$ desvio padrão), por 100g de amostra fresca, de acordo com o estado de maturação. ....	35
<b>Tabela 5</b> Composição em ácidos gordos de frutos de <i>Arbutus unedo</i> L. com diferentes índices de maturação (percentagem média $\pm$ desvio padrão). SFA-Ácidos gordos saturados; MUFA- Ácidos gordos monoinsaturados; PUFA- Ácidos gordos polinsaturados. ....	38
<b>Tabela 6</b> Composição em tocoferol e tocotrienol (mg/100g de ps) de frutos de <i>Arbutus unedo</i> L. em diferentes índices de maturação. Os valores são apresentados em percentagem (média $\pm$ desvio padrão). ....	42
<b>Tabela 7</b> Características da cor externa pelo método CIELAB da evolução da cor de acordo com o índice de maturação em frutos de <i>Arbutus unedo</i> L. (média $\pm$ desvio padrão). ....	44
<b>Tabela 8</b> Característica da cor interna pelo método CIELAB da evolução da cor de acordo com o índice de maturação em frutos de <i>Arbutus unedo</i> L. (média $\pm$ desvio padrão). ....	44
<b>Tabela 9</b> Composição em $\beta$ -caroteno (mg /100g) em frutos de <i>Arbutus unedo</i> L. (média $\pm$ desvio padrão) com diferentes índices de maturação. ....	45
<b>Tabela 10</b> Composição em antocianinas (mg /100g) em frutos de <i>Arbutus unedo</i> L. (média $\pm$ desvio padrão) com diferentes índices de maturação. ....	47
<b>Tabela 11</b> Rendimento de extração, EC <sub>50</sub> de DPPH e Poder redutor (mg de extrato/ml) ao longo da maturação do fruto de <i>Arbutus unedo</i> . (média $\pm$ desvio padrão). ....	48

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Aspeto geral da árvore de <i>Arbutus unedo</i> (A), e em pormenor do seu tronco onde se visualiza o ritidoma (B), folhas (C), flores (D), fruto – medronho (E) e sementes (F).....	2
<b>Figura 2.</b> Mapa da distribuição de <i>Arbutus unedo</i> na bacia do Mediterrâneo (Oliveira <i>et al.</i> , 2011b).....	3
<b>Figura 3.</b> Frutos de <i>Arbutus unedo</i> .....	5
<b>Figura 4.</b> Folhas de <i>Arbutus unedo</i> .....	8
<b>Figura 5.</b> Composição química das folhas de <i>Arbutus unedo</i> . De acordo com [1] Carcache-Blanco <i>et al.</i> (2006); [2] Fiorentino <i>et al.</i> (2007); [3] Gaspar <i>et al.</i> (1997); [4] Legssyer <i>et al.</i> (2004); [5] Males <i>et al.</i> (2006); [6] Sanjust <i>et al.</i> (2008); [7] Kivçak & Mert (2001); [8] Kivcak <i>et al.</i> (2001). .....	9
<b>Figura 6.</b> Curva de correlação dos rendimentos de extração (% p/p) com a capacidade redutora total (mg GAE/g extrato) presentes nos extractos etanólicos de cascas, folhas, flores e frutos de <i>A. unedo</i> . .....	19
<b>Figura 7.</b> Valores de poder redutor para os extratos de diferentes partes de <i>Arbutus unedo</i> L. ....	21
<b>Figura 8.</b> Efeito bloqueador de radicais de DPPH (%) para os extratos de diferentes partes de <i>Arbutus unedo</i> L.. Cada valor é expresso em termos de média ± desvio padrão. ....	22
<b>Figura 9.</b> Efeito da capacidade redutora total no efeito bloqueador de radicais de DPPH (%) (a) e no poder redutor (mg/mL) (b). ....	23
<b>Figura 10.</b> Medronhos após colheita. ....	28
<b>Figura 11.</b> Índices de maturação considerados neste trabalho, de 1 a 6 como ilustrado. ....	28
<b>Figura 12.</b> Frutos de <i>Arbutus unedo</i> em diferentes estados de maturação. ....	32
<b>Figura 13.</b> Extratos de medronhos em diferentes estados de maturação para leitura de carotenóides. ....	32
<b>Figura 14.</b> Extratos de medronhos em diferentes estados de maturação para análise de antocianinas. ....	32
<b>Figura 15.</b> Agrupamento em classes SFA, MUFA, PUFA de frutos de <i>Arbutus unedo</i> L. com diferentes índices de maturação (percentagem média ± desvio padrão). .....	40

<b>Figura 16.</b> Análise de componentes principais, utilizando os resultados do perfil em ácidos gordos de frutos de <i>Arbutus unedo</i> com diferentes índices de maturação. Os factores da PCA explicam 56,46% da variância total. ....	41
<b>Figura 17.</b> Índices de maturação onde foram realizadas as leituras da cor .....	43
<b>Figura 18.</b> Cromatogramas de extracto do fruto de <i>Arbutus unedo</i> L. para os diferentes índices de maturação avaliados. Pico 1, delfinina-3-galactosídeo; pico2, ciadinina-3-galactosídeo; pico 3, cianidina-3-glucosídeo; pico 4, ciadinina-3-arabinose; pico 5, delfinina. Os números de 1-6 representam os seis IM.....	46
<b>Figura 19.</b> Valores de poder redutor, média $\pm$ desvio padrão, para os extratos de seis índices de maturação, de frutos de <i>Arbutus unedo</i> L. IM-Índice de Maturação.....	49
<b>Figura 20.</b> Efeito bloqueador de radicais de DPPH (%), média $\pm$ desvio padrão, para os extratos de seis índices de maturação de frutos de <i>Arbutus unedo</i> L.. IM-Índice de Maturação. ....	49
<b>Figura 21.</b> Análise das componentes principais (ACP), utilizando, cor, $\beta$ -caroteno, antocianinas, capacidade redutora total, $EC_{50}$ de DPPH e poder redutor) dos seis índices de maturação de <i>Arbutus unedo</i> em estudo. Os factores da ACP explicam 86,32% da variância total. ....	50



## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO / OBJETIVOS

## 1.1 Introdução

O medronheiro (*Arbutus unedo* L.), também conhecido como ervedeiro, érvodo e ervedo, pertence à classe Magnoliatae (Dicotyledoneae), subclasse Asteridae, ordem Ericales e família Ericaceae. Cresce em forma de arbusto ou árvore, podendo atingir cerca de 1,5 a 3m, possui folha perene, copa arredondada e densa (Fig. 1A). O tronco e os ramos são tortuosos e o ritidoma (casca) é fendilhado e geralmente acastanhado (Fig. 1B). As folhas, geralmente de 4 a 12cm de comprimento, com margens serradas, apresentam cor verde-escura na página superior e mais clara na inferior, e são classificadas como alternas, simples e lanceoladas (Fig. 1C) (Males *et al.*, 2006). As flores, hermafroditas e dispostas em inflorescências pendentes de 4 a 5 cm, apresentam cor rosa esbranquiçada, são pequenas, e a corola e o cálice apresentam uma forma campanulada (Fig. 1D).



**Fig. 1** Aspeto geral da árvore de *Arbutus unedo* (A), e em pormenor do seu tronco onde se visualiza o ritidoma (B), folhas (C), flores (D), fruto – medronho (E) e sementes (F).

Os frutos apresentam uma forma esférica e são granulosos na sua superfície, com cerca de 2-3 cm de diâmetro, de cor vermelha-alaranjada quando maduros (Fig. 1E). As sementes são pequenas, angulares e de cor castanha (Fig. 1F).

O medronheiro é uma planta nativa da bacia do Mediterrâneo, podendo ser encontrada por toda a zona sul da Europa (Fig. 2). Em Portugal, predomina na zona sul do país, região das Serras do Caldeirão e Monchique (Algarve), encontrando-se no entanto difundida por todo o território nacional, inclusive em Trás-os-Montes (Pedro, 1994).



**Fig. 2** Mapa da distribuição de *Arbutus unedo* na bacia do Mediterrâneo (Oliveira *et al.*, 2011b).

## 1.2. Importância do medronheiro

O medronheiro é uma espécie com elevada importância ecológica, ornamental, económica, alimentar e medicinal. A nível ecológico, desempenha funções na preservação da fauna e na conservação da paisagem, uma vez que este cresce em solos pobres, acidentados, rochosos, alcalinos ou ácidos (Gomes & Canhoto, 2009). Possui ainda uma forte capacidade de regeneração após incêndios (Konstantinidis *et al.*, 2006), evitando a erosão dos solos, e pode também ser utilizado na fitorremediação de solos contaminados com arsénio (Moreno-Jiménez *et al.*, 2008). A sua baixa

combustibilidade permite-lhe ainda ter um papel importante na prevenção de incêndios florestais.

Uma particularidade desta espécie consiste no facto de as flores surgirem no outono, juntamente com os frutos do ano anterior que, por serem muito decorativos, a tornam uma espécie ornamental muito popular (Males *et al.*, 2006). Os seus ramos são muito utilizados para arranjos florais e a planta no seu todo é utilizada como ornamento em jardins públicos ou nos modernos “jardins comestíveis”.

A nível económico, o medronho é utilizado diretamente em culinária e pastelaria, podendo ainda ser transformado em diversos produtos alimentares tais como geleias, doces, compotas, licores (Simonetti *et al.*, 2008; Pawlowska *et al.*, 2006) e aguardentes. Em Portugal, a aguardente de medronho é muito conhecida e apreciada principalmente no sul do país (Alarcão-e-Silva *et al.*, 2001; Pallauf *et al.*, 2008) sendo famosa a aguardente de medronho de Monchique e da Serra do Caldeirão. As folhas e as cascas podem também ser utilizadas na curtição de peles, dada a sua riqueza em taninos. A madeira, para além de constituir lenha de boa qualidade, pode também ser utilizada para fabricar carvão vegetal.

Ressalta-se também o seu potencial a nível medicinal. Neste âmbito, várias partes da planta têm sido utilizadas. O medronho é usado pelas suas propriedades diuréticas, antissépticas das vias urinárias e laxativas (Ziyyat *et al.*, 1997; Ziyyat & Boussairi, 1998; Mariotto *et al.*, 2008, Afkir *et al.*, 2008; Pallauf *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2011b). São ainda utilizados na medicina tradicional, no tratamento de diversas doenças, tais como distúrbios gastrointestinais, dermatológicos, urológicos, cardio vasculares (Leonti *et al.*, 2009), doenças renais (El Hilaly *et al.*, 2003) e gastrite (Cornara *et al.*, 2009).

As folhas são usadas em infusões, pelo interesse nas suas propriedades antioxidantes, adstringentes, diuréticas, antissépticas, antidiarreicas e depurativas. São-lhes ainda atribuídas propriedades importantes no tratamento de doenças como hipertensão, diabetes e problemas inflamatórios (Ziyyat & Boussairi, 1998; Mariotto *et al.*, 2008; Afkir *et al.*, 2008). Na medicina popular são também aproveitadas as cascas e as raízes, no tratamento de distúrbios gastrointestinais, urológicos e de problemas dermatológicos (Novais *et al.*, 2004; Leonti *et al.*, 2009).

### 1.3. Composição química dos frutos e folhas de medronheiro

O reconhecido interesse económico e medicinal do medronheiro tem incentivado a realização de estudos que visam caracterizar quimicamente esta espécie. A maioria destes estudos tem recaído, em especial, no medronho e, em menor número, nas folhas, cascas, flores e raízes.

#### 1.3.1. Frutos

O medronho (Fig. 3) é constituído essencialmente por água, açúcares (sacarose, glucose e frutose), ácidos orgânicos e fenólicos, proteínas e minerais, em especial potássio (K), cálcio (Ca) e fósforo (P), tal como indicado na Tabela 1 (Ayaz *et al.*, 2000; Alarcão-e-Silva *et al.*, 2001; Özcan & Haciseferoğullari, 2007; Barros *et*



**Fig. 3** Frutos de *Arbutus unedo*

*al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011b). O teor de alguns destes compostos pode variar ainda com o estado de maturação do fruto (Alarcão-e-Silva *et al.*, 2001). O medronho possui também na sua composição compostos com propriedades antioxidantes, como sejam fenóis, vitaminas (C e E), carotenóides, ácidos orgânicos, ácido elágico, derivados de ácido gálico e flavonóides (Alarcão-e-Silva *et al.*, 2001; Kivçak & Mert, 2001; Pawlowska *et al.*, 2006; Males *et al.*, 2006; Pallauf *et al.*, 2008). Estes frutos apresentam ainda uma fracção volátil, avaliada por Oliveira *et al.*, (2011a), onde foram detetadas seis classes químicas (álcoois, aldeídos, esterres, norisoprenoides, sesquiterpenos e monoterpenos), num total de 41 compostos.

A composição química segundo diversos autores é apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1** Composição química de frutos de *A. unedo*.

<b>Composto</b>	<b>Conteúdos</b>	<b>Referência</b>
<b>Humidade (%)</b>	≈ 56,6	[3,7,10]
<b>Hidratos de carbono (g/100g)</b>	23,55(pf); 93,83(ps)	[3,10]
<b>Açúcares (g/100g)</b>	16,21(pf); 40,55 (ps); 52,21 (ps)	[2,3,10]
Sacarose (g/100g)	0,4(pf); 8,77(V) - 8,68(M)(ps); 1,8 (ps); 4,2(ps)	[1-3,10]
Frutose (g/100g)	10,4(pf); 2,33(V)- 20,8(M)(ps); 24,2(ps); 27,8(ps)	[1-3,10]
<b>Proteínas (g/100g)</b>	0,90(pf); 3,36(pf); 4,6(V)-3,0(M)(ps); 3,09(ps)	[1,3,7,10]
<b>Gorduras (g/100g)</b>	0,6(pf); 2,1(pf); 1,4(ps)	[3,7,10]
α-linoleico (%)	36,5; 36,9(V) - 41,6(I) - 43,1(M)	[3,6]
PUFA (%)	52(V)-60(I)-62(M); 58,28	[3,6]
<b>Cinzas (g/100g)</b>	0,86(pf); 1,71(ps); 2,82(pf)	[3,7,10]
<b>Fibras (g/100g)</b>	16,2(pf); 6,4(pf)	[7,10]
<b>Valor energético (Kcal/100g)</b>	101,00(pf); 399,99(ps)	[3,7,10]
<b>Ácidos orgânicos (g/Kg)</b>		
Quínico	73,5(V)-59,9(M)(ps)	[1]
Fumárico	7,29(pf); 1,94(ps);	[2,10]
Láctico	4,9(ps)	[2]
Málico	2549(pf); 0,84(ps)	[2,10]
Subérico	0,23(ps)	[2]
Cítrico	0,01(ps)	[2]
<b>Ácidos fenólicos (g/Kg ps)</b>		
Gálico	10,7	[2]
Gentísico	1,9	[2]
Protocatecuico	0,6	[2]
p-hidroxibenzóico	0,3	[2]
Vanílico	0,12	[2]
Anisíco	0,05	[2]
<b>Fenóis Totais (mg GAE/g de extrato)</b>	16,56(pf); 25,35(V)-48,26(I)-26,81(M)(ps); 126,83(ps); 37,60(pf); 16,46(ps)	[3-6,10]
<b>Antocianinas (mg/100g)</b>	25(V)-10,1(M)(ps); 3,77(pf); 76,26 mg eq. cianidina-3-glucosideo/100g	[1,4,8]
Cianidina-3-glucosideo	0,12(pf); 0,39(pf)	[8,9]
Cianidina-3-galactosideo	2,84(pf)	[8]
<b>Proantocianinas (mg/100g)</b>	27,46(pf)	[8]
<b>Taninos (mg/100g)</b>	313(V)-175(M)(ps)	[1]

**Tabela 1** Continuação

<b>Compostos minerais (mg/kg)</b>		
Al	20,11(ps)	[7]
As	10,58(ps)	[7]
B	16,03(ps)	[7]
Ca	665,4(pf); 4959,02(ps)	[7,10]
Cd	0,19(ps)	[7]
Cr	2,41(ps)	[7]
Cu	1,25(pf); 1,65(ps)	[7,10]
Fe	8,85(pf); 12,15(ps)	[7,10]
Ga	0,47(ps)	[7]
K	1773(pf); 14909,08(ps)	[7,10]
Li	0,94(ps)	[7]
Mg	196,2(pf); 1315,57(ps)	[7,10]
Mn	0,81(pf); 4,44(ps)	[7,10]
Na	75,2(pf); 701,26(ps)	[7,10]
Ni	0,13(ps)	[7]
P	3668,56(ps)	[7]
Pb	0,51(ps)	[7]
Sr	5,10(ps)	[7]
Ti	0,16(ps)	[7]
V	16,63(ps)	[7]
Zn	4,71(pf); 8,09(ps)	[7,10]
<b>Vitamina E (mg/100g)</b>	23,46(ps); 136,85(V)-93,44(I)-55,66(M)(ps)	[3,6]
$\alpha$ - tocoferol	0,023(pf);21,98(ps); 27,1(V)-27,88(I); 3,22(M)(ps);	[3,6,8]
<b>Vitamina C (mg/100g)</b>	6,03(pf); 15,07(ps); 542(V)-346(M)(ps); 182,4(pf)	[1,3,8,10]
<b>Carotenóides (mg/100g)</b>	0,064(pf)	[8]
Luteína + zeoxantina	0,042(pf)	[8]
$\beta$ -caroteno	0,025(pf); 1,07(ps); 38,1(V)-70,9(M)(ps); 0,520(pf)	[1,3,8,10]

Maturação: (V)-verde, (I)-intermédio, (M)-maduro; ps-peso seco, pf- peso fresco.

[1] Alarcão-e-Silva *et al.* (2001); [2] Ayaz *et al.* (2000); [3] Barros *et al.* (2010); [4] Fortalezas *et al.* (2010); [5] Heinrich (2005); [6] Oliveira *et al.* (2011a); [7] Özcan & Haciseferoğullari (2007); [8] Pallauf *et al.* (2008); [9] Pawloska *et al.* (2006); [10] Ruiz-Rodríguez *et al.* (2011).

### 1.3.2. Folhas

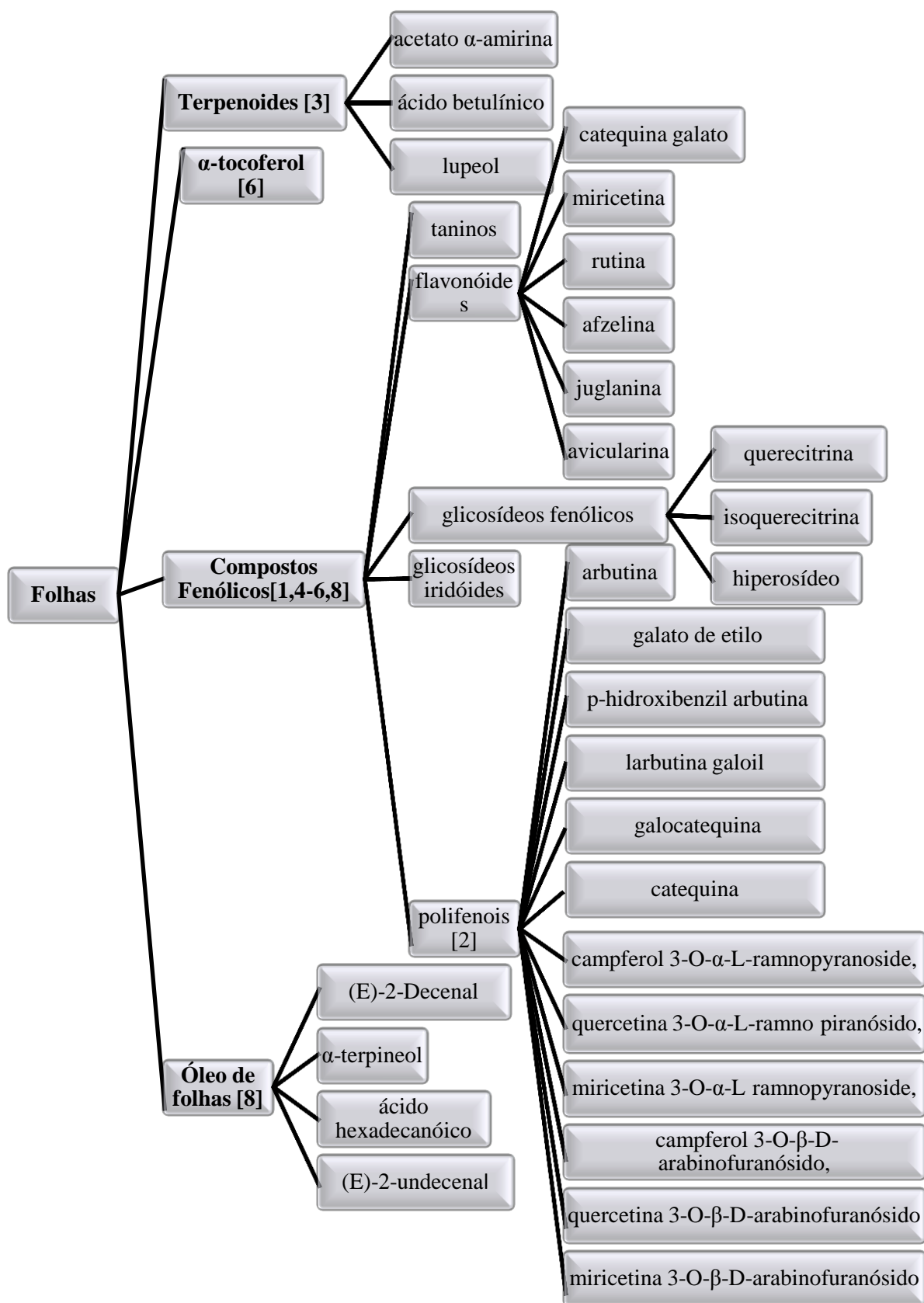
Na sua constituição, as folhas (Fig. 4) contêm várias classes de compostos químicos (Fig. 5) que lhes conferem propriedades antioxidantes e medicinais. Compostos como terpenóides,  $\alpha$ -tocoferol (Kivçak & Mert, 2001), óleos essenciais e compostos fenólicos como taninos, flavonóides e voláteis (Males *et al.*, 2006; Fiorentino *et al.*, 2007).



**Fig. 4** Folhas de *Arbutus unedo*

Dependendo da altura do ano em que as folhas são colhidas, o teor em  $\alpha$ -tocoferol varia, sendo detetadas pequenas quantidades deste composto (0,01328% de peso seco). No entanto, as fontes de  $\alpha$ -tocoferol utilizadas industrialmente, como é o caso do feijão e da soja, apresentam valores muito semelhantes (Kivçak & Mert, 2001), o que poderá demonstrar a potencialidade desta parte da planta.

A quantidade total de fenóis presentes nas folhas foi de 192,66 mg de GAE/ g de extracto (Oliveira *et al.*, 2009) e 16 mg de GAE/g ps (Fortalezas *et al.*, 2010). O composto fenólico detetado em maior quantidade foi a arbutina (62,7 mg/100 g de folhas frescas), seguida da catequina (54,6 mg/100 g de folhas frescas) e etilgalato (44,0 mg/100 g folhas frescas) (Fiorentino *et al.*, 2007).



**Fig. 5** Composição química das folhas de *Arbutus unedo*. De acordo com [1] Carcache-Blanco *et al.* (2006); [2] Fiorentino *et al.* (2007); [3] Gaspar *et al.* (1997); [4] Legssyer *et al.* (2004); [5] Males *et al.* (2006); [6] Sanjust *et al.* (2008); [7] Kivçak & Mert (2001); [8] Kivcak *et al.* (2001).

#### 1.4. Enquadramento e objetivos do trabalho

Em Trás-os-Montes, ao contrário do verificado nas restantes regiões nacionais (em especial do Algarve) e também internacionais, tem sido atribuída pouca importância económica ao medronheiro. Face à subutilização desta espécie fruteira, tem-se assistido, nos últimos anos, à sua substituição por espécies florestais. Esta prática, juntamente com os fogos florestais, a ação antropológica e a desertificação das zonas rurais, tem contribuído para a redução da área ocupada pelo medronheiro.

Apesar de alguns estudos relativos à composição química e biológica em *A. unedo* terem sido já realizados, estes centram-se na sua maioria nos frutos e folhas. Por outro lado, a casca dos troncos e as flores, não têm recebido qualquer atenção pela comunidade científica. Similarmente, o efeito do estado de maturação do medronho na composição química e biológica tem sido pouco estudado.

Neste sentido, o presente trabalho, visa aumentar o conhecimento do efeito da maturação do medronho na sua composição química, física (cor) e propriedades antioxidantes. Pretende ainda conhecer a atividade antioxidante das folhas e, pela primeira vez, das cascas e flores.

Especificamente é proposto:

- ❖ Avaliar a atividade biológica das diferentes partes do medronheiro (casca, folhas, flores e frutos) (Capítulo 2);
- ❖ Avaliar de que forma a maturação influencia as propriedades químicas, físicas e bioativas dos frutos (Capítulo 3).

Espera-se que a caracterização fitoquímica das diferentes partes que compõem o medronheiro (folhas, flores, frutos e casca) e o conhecimento da sua atividade biológica, possam potenciar a produção, comercialização e consumo desta espécie. Tendo em conta as suas propriedades medicinais, pretende-se que o medronheiro assuma uma maior relevância como mecanismo dinamizador da economia regional transmontana.



## CAPÍTULO 2

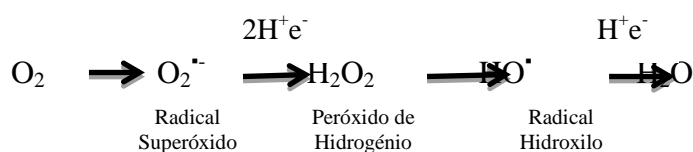
# ATIVIDADE BIOLÓGICA DE DIFERENTES PARTES DE *ARBUTUS UNEDO* L.



## 2.1. Introdução

Durante os processos metabólicos nos organismos aeróbios, os radicais livres são constantemente produzidos, principalmente nos organelos citoplasmáticos, em grande parte sob a forma de espécies reativas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS) (Ferreira & Abreu, 2007).

As ROS são a classe de radicais livres mais importante geradas pelo organismo e derivam da ativação ou redução do oxigénio molecular ( $O_2$ ) (Esquema 1).



**Esquema 1.** Formação de espécies reativas de oxigénio por redução do oxigénio molecular.

Em pequenas concentrações as ROS podem ser benéficas para as células (Fridovich, 1999). No entanto, se a produção endógena for excessiva, bem como a exposição a radicais livres exógenos, o equilíbrio entre as ROS e as defesas antioxidantes pode ser destruído (Machlin & Bendich, 1987; Cerutti *et al.*, 1994) e a célula entra em stresse oxidativo. Estas espécies quando presentes em quantidades excessivas podem causar danos graves na saúde como mutagénese, carcinogénese, processos inflamatórios, envelhecimento, aterosclerose, entre outros (Miller *et al.*, 1990; Aruoma, 1996; Finkel & Holbrook, 2000; Pulido *et al.*, 2000). Desta forma, o oxigénio molecular apesar de ser essencial à vida aeróbia também poderá ser tóxico, fenómeno ao qual se atribui a designação de “paradoxo do oxigénio” (Gilbert, 2000).

As RNS são também importantes, sendo o principal RNS o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ). Em excesso, estas espécies podem causar danos mitocondriais e celulares, devido ao stresse nitrosamínico. A sobreexpressão de RNS pode conduzir à nitrosilação de proteínas, inibindo a sua função (Ridnour *et al.*, 2004). Podem ainda funcionar como agentes oxidantes, levar à fragmentação do ADN (ácido desoxirribonucleico) e promover a oxidação lipídica (Carr *et al.*, 2000).

Para combater a sobreexpressão intracelular das ROS e RNS e evitar danos, foram desenvolvidos mecanismos endógenos de defesa antioxidante, que podem ser enzimáticos e não enzimáticos (Sies, 1993). O sistema enzimático é formado por diversas enzimas, onde se destacam a superóxido dismutase (SOD), responsável pela eliminação do  $O_2^{\cdot-}$ , e as enzimas catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX), que participam na decomposição do  $H_2O_2$ . Os principais antioxidantes não-enzimáticos presentes no organismo humano são a glutathione, bilirrubina, ácido úrico, coenzima Q10, ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e os carotenóides (Gopinathan *et al.*, 1994).

No entanto, estes mecanismos nem sempre são eficazes na neutralização dos radicais livres produzidos podendo a dieta alimentar apresentar-se como uma boa estratégia para veicular uma vasta gama de antioxidantes exógenos. Estes antioxidantes são obtidos sobretudo a partir do consumo de produtos de origem vegetal, em especial de frutas e legumes, sob a forma de vitaminas (ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol), minerais (selênio e zinco), carotenóides, flavonóides e outros compostos fenólicos (Bianchi & Antunes, 1999). Deste modo, o consumo de produtos de origem vegetal com atividade antioxidante pode ser útil no auxílio do sistema endógeno protetor, contra a produção de radicais livres, podendo ser utilizados como nutracêuticos. Nos últimos anos, têm aparecido vários antioxidantes naturais, a maioria dos quais, obtidos de diferentes partes das plantas tais como de sementes, frutos, folhas e raízes. Alguns exemplos de produtos comercializados incluem alimentos integrais e bebidas (ex. chá e infusões, hibisco, *Ginkgo biloba*) bem como substâncias isoladas, vendidas, principalmente como suplementos alimentares (e.g. ácido ascórbico, licopeno, selênio) (Finley *et al.*, 2011).

Desde os tempos ancestrais, *A. unedo* é utilizado na medicina tradicional, as infusões e decocções de diferentes partes do medronheiro (raiz, casca e folhas) eram aplicadas no tratamento de diversos problemas de saúde tais como hipertensão, diabetes e doenças inflamatórias, dermatológicas, urológicas, gastrointestinais, cardíacas e renais (Oliveira *et al.*, 2011b). Estes preparados são também conhecidos por possuírem propriedades antisépticas, diuréticas, laxantes, antidiarreicas e depurativas (Oliveira *et al.*, 2011b). A natureza química dos compostos responsáveis por estas propriedades medicinais tem vindo a ser estudada por diversos investigadores que têm centrado o seu estudo na análise da atividade biológica, fitoquímica e fitofarmacêutica de folhas e frutos do medronheiro (Percival, 1998; Pallauf *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2009;

Oliveira *et al.*, 2011 a,b; Isbilir *et al.*, 2012). A análise da composição nutricional dos frutos tem sido igualmente alvo de estudo (Alarcão-e-Silva *et al.*, 2001; Özcan & Haciseferoğullari, 2007; Barros *et al.*, 2010; Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2011). Pelo contrário, as flores bem como a casca do tronco do medronheiro, nunca foram estudadas.

Neste capítulo, a capacidade antioxidante de diversos órgãos do medronheiro (folha, casca, flor e fruto) vai ser abordada de forma a comparar os seus potenciais usos na indústria farmacêutica, cosmética e alimentar.

## **2.2 Material e métodos**

### **2.2.1. Amostras**

Ramos e frutos de *A. unedo* foram colhidos de 15 árvores, selecionadas aleatoriamente, num povoamento florestal natural localizado à entrada de Vinhais, perto da estrada N.103 (41°44'40.15"N7°27'7.56"W), em outubro de 2011. O material colhido foi colocado em sacos estéreis e transportado para o laboratório sob condições refrigeradas. No laboratório, as folhas e as flores foram destacadas dos ramos e a casca foi removida da superfície dos ramos com o auxílio de um bisturi. As amostras foram misturadas e posteriormente separadas em três réplicas de peso idêntico. Todo o material vegetal (flores, folhas, casca e frutos) foi, em seguida, desidratado numa estufa ventilada (Memmert Schwabach 854), à temperatura de 40±2°C, até estabilização do peso. Após secagem, as amostras foram trituradas ( $\leq 20$  mesh) e colocadas em tubos de *Falcon* que foram etiquetados e armazenados num local escuro e seco (exsicador) até à preparação dos extratos.

### **2.2.2 Reagentes**

O 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) e o reagente de fenol Folin–Ciocalteu foram fornecidos pela Sigma (St. Louis, MO, EUA) e Fluka (Suiça), respetivamente. O metanol foi fornecido pela Pancreac (Espanha) e o etanol 96% pela Riedel-de Haen. Os restantes reagentes químicos foram obtidos pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). A água utilizada foi obtida por um sistema de purificação Mili-Q (TGI Pure Water Systems, EUA).

### **2.2.3 Preparação dos Extratos**

De cada amostra (folhas, flores, frutos e cascas) foram preparados extratos, pesando 1,5g de pó, que foram dissolvidos em 25mL de etanol a 96%, sob agitação (250 rpm), durante 3×30 min., no escuro e à temperatura ambiente. Após filtração por meio de papel de filtro Whatman nº4, procedeu-se à remoção do solvente num evaporador rotativo (Evaporador rotativo Büchi R-210), à temperatura de 40°C, até evaporação total do solvente ( $\approx 10$ min.). Aquando a análise, os extratos obtidos foram dissolvidos em água destilada para uma concentração final de 50mg/mL.

## **2.2.4 Atividade Antioxidante**

A atividade antioxidante dos extratos das diferentes partes vegetais de *A. unedo* (folhas, flores, frutos e cascas) foi avaliada por diferentes métodos, nomeadamente pelo método de Folin-Ciocalteu, para avaliação da capacidade redutora total, pelo método do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) e finalmente pelo método do poder redutor.

### ***2.2.4.1. Capacidade Redutora Total pelo método Folin-Ciocalteu***

O teor total de fenóis foi determinado pela avaliação da capacidade redutora total dos extratos das amostras, de acordo com o procedimento descrito em Singleton e Rossi (1965), no entanto com algumas modificações. Assim, misturou-se 1 mL de solução de extrato com 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Após agitação vigorosa, seguida por um período de repouso de 3 min., adicionou-se 1 mL de solução de carbonato de sódio saturada. De seguida, fez-se até um volume final de 10 mL, com água destilada. A reação foi mantida no escuro durante 90 min., após os quais se leu a absorvância a 725 nm (Genesys 10 UV, Thermo Electron Corporation). Usou-se o ácido gálico para calcular a reta padrão, tendo os resultados sido expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico (GAE) por grama de extrato.

### ***2.2.4.2 Efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-Difenil-1-picrihidrazilo (DPPH)***

A capacidade de eliminar os radicais livres DPPH foi realizada de acordo com metodologias anteriormente reportadas por Oyaizu (1986). Para tal, misturaram-se 0,3 mL das várias concentrações de extratos de cada amostra, com 2,7 mL de uma solução metanólica, contendo radicais de DPPH ( $6 \times 10^{-5}$  mol/L). O preparado foi agitado vigorosamente e deixado em repouso, em ambiente escuro, até serem atingidos valores de absorvância estáveis. A redução do radical de DPPH foi avaliada através da monitorização do decréscimo da absorvância a 517 nm num espectrofotómetro (Genesys 10 UV, Thermo Electron Corporation).

O efeito bloqueador do DPPH foi calculado em percentagem de descoloração do DPPH, usando a equação: efeito bloqueador % =  $[(ADPPH - AS)/ADPPH] \times 100$ , onde AS corresponde à absorvância da solução com extrato da amostra e ADPPH diz respeito

à absorvância da solução de DPPH. A concentração do extrato que proporciona 50% de inibição (EC50) foi calculada a partir de um gráfico de percentagem de efeito bloqueador, em função da concentração de extrato.

#### **2.2.4.3 Poder Redutor**

O poder redutor foi determinado de acordo com Berker *et al.*, (2007). Para tal, misturaram-se 1 mL das várias concentrações de extratos de cada amostra com 2,5 mL de solução de tampão fosfato de sódio (200 mmol/L, pH 6,6) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio a 1%. A mistura foi agitada vigorosamente e posteriormente incubada a 50°C (Memmert Schwabach 854) durante 20 min. Após esse período, foram adicionados 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% (m/v) e centrifugou-se a 1000 rpm numa centrífuga refrigerada a 4°C (Centorion K24OR) durante 8 min. Retiraram-se 2,5 mL de sobrenadante que foram misturados com 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico a 0,1% (m/v). Os valores de absorvância foram medidos a 700 nm no espectrofotómetro supra mencionado. A concentração do extrato que fornece 0,5 de absorvância (EC50) foi calculada a partir do gráfico da absorvância registada a 700 nm, em função da concentração de extrato correspondente.

#### **2.2.5. Análise estatística**

Para cada amostra, foram realizadas três extrações independentes, e todos os ensaios da avaliação da atividade antioxidante dos extractos foram realizados em duplicado. Os resultados foram expressos em valores médios  $\pm$  desvio padrão (DP) e as diferenças entre as médias foram obtidas por análise da variância a um fator (ANOVA), seguidas pelo teste de Tukey HSD com  $\alpha = 0,05$  ou Dunnett. O tratamento foi realizado usando o software SPSS 17.

### 2.3. Resultados e Discussão

No presente trabalho, pretendeu-se fazer uma comparação da capacidade antioxidante de diferentes partes de *A. unedo* (cascas, folhas, flores e frutos). A determinação da atividade antioxidante de extratos de plantas, está dependente em grande parte das condições de extração que vão condicionar a composição dos extratos. Em estudos anteriores efetuados na mesma matriz vegetal, foi verificado que o etanol a 96% foi o solvente de extração que melhores resultados originou (Oliveira *et al.*, 2009). Deste modo, optou-se por utilizar este solvente para extrair os compostos antioxidantes dos diferentes órgãos de *A. unedo*. A capacidade antioxidante dos extratos obtidos foi avaliada por três métodos diferentes, nomeadamente a capacidade redutora total, o efeito bloqueador de radicais de DPPH e poder redutor.

Os valores do rendimento, bem como a determinação da capacidade redutora total das diferentes partes do medronheiro, encontram-se expressos na Tabela 2. Estes apresentam diferenças significativas entre si ( $p < 0,001$ ), o que indicará diferenças na composição dos extratos. As cascas foram a parte da planta que apresentou um menor rendimento de extração ( $8,34 \pm 1,30$  %, p/p), enquanto nos frutos se obteve o maior rendimento de extração ( $43,59 \pm 3,86$  %, p/p), seguidos das flores ( $28,89 \pm 1,22$  %, p/p) e das folhas ( $20,30 \pm 1,61$  % p/p).

A determinação da capacidade redutora total foi efetuada pelo método de Folin-Ciocalteu. Na maioria dos trabalhos consultados, usam esta metodologia para a determinação do teor em fenóis totais em extratos vegetais. Contudo, este método contém algumas limitações. É pouco específico e normalmente os valores obtidos são muito sobrestimados (Magalhães *et al.*, 2008). Deste modo, na atualidade os investigadores preferem usar os valores obtidos como capacidade redutora total e não como teor em fenóis totais, tendo sido esta ótica também por nós adotada. Assim, os extratos de medronhos (frutos) foram os que apresentaram um menor valor,  $58,83 \pm 1,82$  mg GAE/g de extrato, enquanto os valores registados nas cascas foram significativamente superiores,  $158,93 \pm 6,71$  mg GAE/ g de extrato (Tabela 2). As flores e folhas apresentaram valores muito similares e intermédios das cascas e frutos.

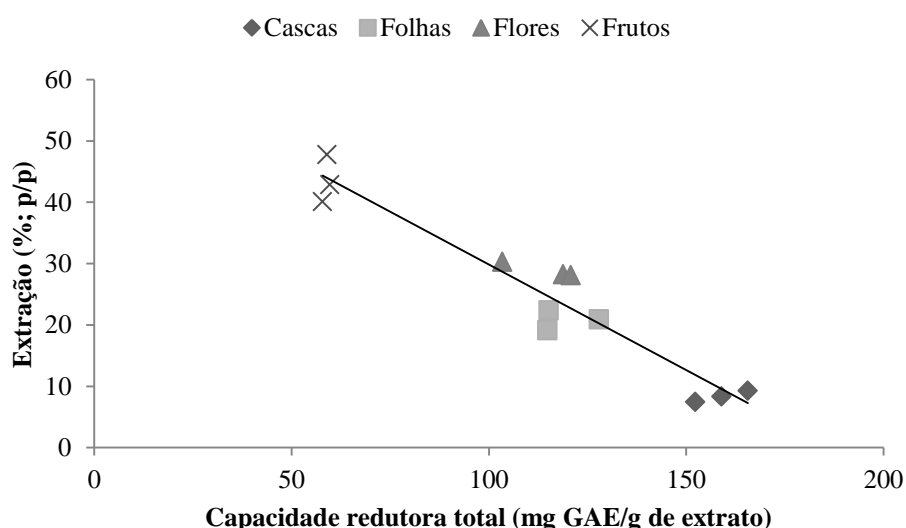
**Tabela 2** Rendimento de extração (média  $\pm$  desvio padrão) e capacidade redutora total de *Arbutus unedo* L. (cascas, folhas, flores e frutos).

Matriz	Rendimento (g)	Rendimento de extração (%; p/p)	Capacidade redutora total (mg GAE/g de extrato)
Cascas	0,09 $\pm$ 0,01	8,34 $\pm$ 1,30 <sup>a</sup>	158,93 $\pm$ 6,71 <sup>c</sup>
Folhas	0,31 $\pm$ 0,02	20,30 $\pm$ 1,61 <sup>b</sup>	119,29 $\pm$ 7,07 <sup>b</sup>
Flores	0,43 $\pm$ 0,02	28,89 $\pm$ 1,22 <sup>c</sup>	114,32 $\pm$ 7,81 <sup>b</sup>
Frutos	0,44 $\pm$ 0,03	43,59 $\pm$ 3,86 <sup>d</sup>	58,83 $\pm$ 1,82 <sup>a</sup>
<i>p</i>		***	***
<i>R</i> <sup>2</sup>		0,969	0,894

<sup>a-d</sup> em cada coluna valores médios com diferentes letras diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

\*\*\*  $p \leq 0,001$  correlação extremamente significativa.

Os resultados obtidos evidenciam que o teor em fenóis totais, ou como optado neste trabalho a capacidade redutora total, foi variável de acordo com os órgãos da planta. A capacidade redutora total para os extratos obtidos de frutos, foi cerca de um terço inferior à dos extratos obtidos de cascas dos caules do medronheiro, indicando uma maior capacidade antioxidante destes últimos. Esta tendência pode ser observada na Fig. 6. Estas variações poderão estar relacionadas com a sua composição em lenhina, apresentando as cascas um maior conteúdo comparativamente às folhas, flores e frutos.

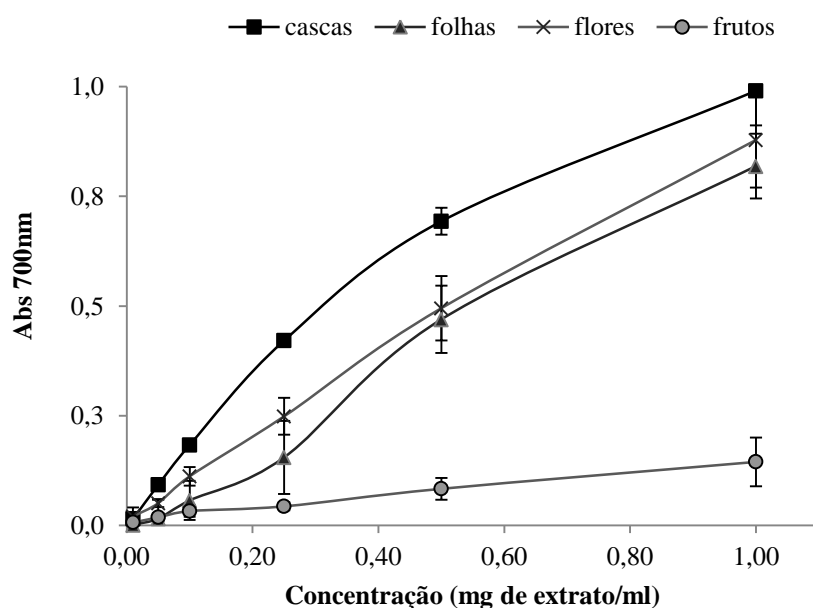


**Fig. 6.** Curva de correlação dos rendimentos de extração (%; p/p) com a capacidade redutora total (mg GAE/g extrato) presentes nos extractos etanólicos de cascas, folhas, flores e frutos de *A. unedo*.

A lenhina é uma molécula que resulta da polimerização de polifenóis e, juntamente com a celulose, é muito abundante nos tecidos vegetais em especial na casca, caule e raízes. A sua presença é fundamental para aumentar rigidez das células e tecidos e a resistência a stresses bióticos e abiótico. A lenhina possui uma estrutura muito complexa, sendo formada a partir de 3 álcoois fenilpropanóides (p-cumarilo, coniferilo e sinapilo). Nas plantas dicotiledóneas, em que se inclui o medronheiro, a lenhina é composta principalmente pelos álcoois p-cumarilo e sinapilo (Goodwin & Mercer, 1983).

Relativamente aos ensaios do poder redutor, estes permitem avaliar a capacidade de redução dos extratos, observável pela transição de cor das soluções de amarelo para verde e azul. Esta transição de cor, bem como a rapidez com que ocorrem, vão depender da quantidade de antioxidantes (redutores) presentes em cada extrato, assim como das suas concentrações. Estes antioxidantes atuam sobre o complexo de ferrocianeto  $Fe^{3+}$ , reduzindo-o à sua forma ferrosa  $Fe^{2+}$ , levando à formação de azul de Prússia Perl, que a partir da leitura no espectrofotómetro a 700nm permite determinar a concentração de  $Fe^{2+}$  (Oliveira *et al.*, 2009). Um aumento da absorvância a 700nm indica um aumento na redução de energia. A capacidade de redução dos extratos pode servir como um indicador significativo do seu potencial antioxidante. Assim, quanto maior a sua capacidade antioxidante, mais facilmente os extratos reagem com radicais livres, estabilizando e terminando reações em cadeia.

Na Fig. 7, estão representados os resultados para a atividade antioxidante de cascas, folhas, flores e frutos de *A. unedo* determinada pelo poder redutor. Verificou-se que os extratos de cascas apresentaram o valor mais elevado de absorvância (próximo de 1), seguido das flores e das folhas (variando entre 0,80 e 0,9 Abs), enquanto os frutos apresentam o menor valor de absorvância (aproximadamente 0,15 Abs). Constatou-se ainda que o poder redutor dos diferentes extratos vegetais estudados aumentou com o aumento da sua concentração. Os resultados obtidos neste estudo relativo aos extratos etanólicos dos frutos e folhas foram semelhantes aos apresentados por Oliveira *et al.* (2009, 2011b).

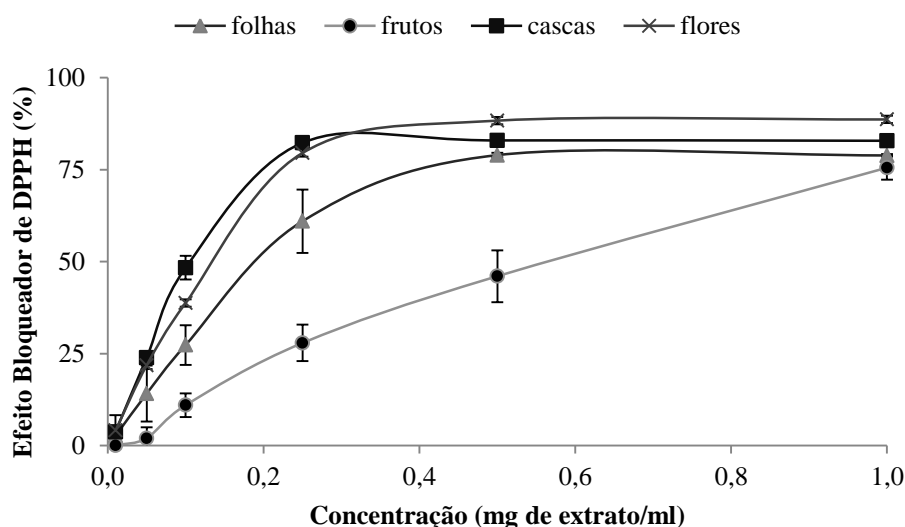


**Fig. 7.** Valores de poder redutor para os extratos de diferentes partes de *Arbutus unedo* L. Cada valor é expresso em termos de média  $\pm$  desvio padrão

O ensaio do DPPH é um dos mais amplamente utilizados em plantas na avaliação da sua capacidade de eliminação de radicais livres. Baseia-se na redução do DPPH• através da adição de um antioxidante que descolora a solução de DPPH, que apresenta cor púrpura, para amarelo (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006). Deste modo, quanto menor a absorvância na presença do extrato, ente 515 e 517 nm (zona de absorvância máxima dos radicais de DPPH), maior será a sua capacidade antioxidante.

Os diferentes extratos de *A. unedo* estudados, demonstraram forte atividade antioxidante a baixas concentrações (Fig. 8). Às 0,2mg de extrato/mL verificam-se efeitos bloqueadores na ordem dos 50 a 80%, à exceção dos frutos, que só a uma concentração de 1mg/mL apresentam valores aproximados aos dos restantes extratos. De entre as diferentes partes de *A. unedo* estudadas, as cascas e as flores, foram as que apresentaram maior atividade captadora de radicais de DPPH.

Os resultados obtidos neste estudo relativos aos extractos das folhas e frutos foram semelhantes aos apresentados por Oliveira *et al.* (2009, 2011b).



**Fig. 8.** Efeito bloqueador de radicais de DPPH (%) para os extratos de diferentes partes de *Arbutus unedo* L.. Cada valor é expresso em termos de média  $\pm$  desvio padrão.

A atividade antioxidante dos diferentes extratos pode ainda ser observada pelos valores de  $EC_{50}$  calculados e apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** Valores de  $EC_{50}$  para DPPH e Poder redutor expressos em mg de extrato/mL (média  $\pm$  desvio padrão) de diferentes partes de *Arbutus unedo* L. (cascas, folhas, flores e frutos).

Matriz	$EC_{50}$ DPPH	$EC_{50}$ Poder Redutor
Cascas	0,11 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,32 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
Folhas	0,21 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,56 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>
Flores	0,14 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,52 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>
Frutos	0,57 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	3,89 $\pm$ 0,62 <sup>b</sup>
<i>p</i>	**	**
<i>R</i> <sup>2</sup>	0,598	0,627

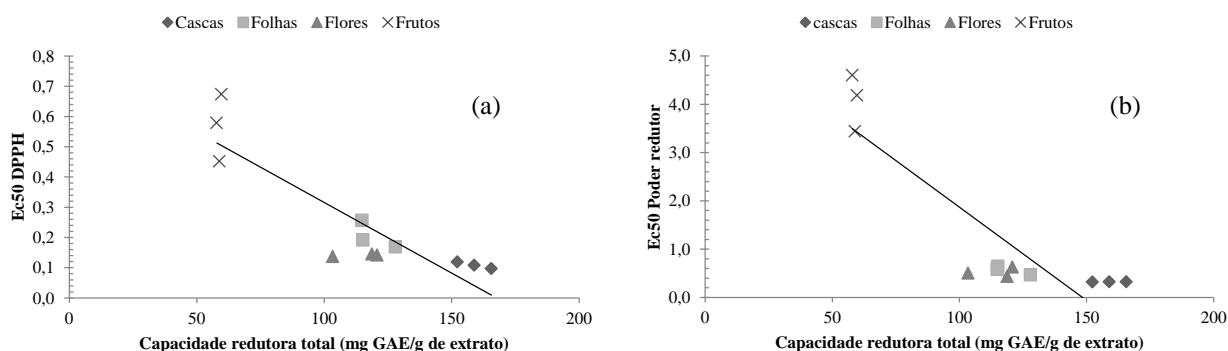
<sup>a-b</sup> em cada coluna valores médios com diferentes letras diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

\*\*  $p \leq 0,01$  – correlação muito significativa.

A elevada atividade antioxidante das cascas pode estar relacionada com baixo valor de  $EC_{50}$  quer para o DPPH (0,11 $\pm$ 0,01 mg de extrato/mL) como para o poder redutor (0,32 $\pm$ 0,01 mg de extrato/mL). Pelo contrário, os frutos apresentam os maiores valores de  $EC_{50}$  para o DPPH (0,57 $\pm$ 0,09 mg de extrato/mL) e poder redutor (3,89 $\pm$ 0,62 mg de extrato/mL). Os valores  $EC_{50}$  representam a concentração de um composto em que 50% do seu efeito máximo é observado. Desta forma, pode-se afirmar que, quanto

menor  $EC_{50}$ , maior e mais rápida será a sua capacidade de inibição a baixas concentrações de radicais livres, bem como a estabilização das reações de oxidação.

A análise da Fig. 9. indica que existe uma correlação negativa entre os valores de fenóis totais obtidos e os valores de  $EC_{50}$  do DPPH ( $EC_{50}$  mg / mL = - 0,0047mg \* fenóis totais mg GAE / mg de extrato + 0,7827;  $R^2 = 0,785$ ;  $p < 0,001$ ) e do poder redutor ( $EC_{50}$  mg / mL = - 0,0386mg \* fenóis totais mg GAE / mL de extrato + 5;728;  $R^2 = 0,7749$ ;  $p < 0,001$ ). Desta forma, para o DPPH, a tendência demonstra que quanto maior a concentração de fenóis num extrato, mais forte é o efeito do radical livre bloqueador. No que respeita ao poder redutor, quanto maior a concentração de fenóis presentes, mais forte e rápida será a reação de redução da potência. Estudos anteriores (Oliveira *et al.*, 2008, 2009) demonstraram esta mesma tendência na correlação da capacidade redutora total, com a atividade antioxidante dos compostos ou extratos.



**Fig. 9.** Efeito da capacidade redutora total no efeito bloqueador de radicais de DPPH (%) (a) e no poder redutor (mg/mL) (b).

## 2.4 Conclusão

Os resultados obtidos demonstram que a planta de *A. unedo* apresenta boas propriedades antioxidantes. O maior potencial antioxidante foi exibido pelas cascas seguido das flores, folhas e por fim pelos frutos. Este resultado é muito interessante dado que indicaram pela primeira vez os excelentes benefícios antioxidantes das cascas de *A. unedo*, possibilitando a sua exploração para o tratamento e prevenção de diferentes doenças, e formulação de medicamentos, suplementos alimentares ou mesmo infusões. As flores, devido às suas propriedades antioxidantes também podem ser exploradas neste âmbito tal como as cascas. Os resultados relativos aos extratos das folhas e frutos confirmaram e validaram os benefícios antioxidantes anteriormente indicados por diversos autores e podem, de igual forma, ser amplamente utilizados, desde a indústria farmacêutica à alimentar, passando ainda pela cosmética.



CAPÍTULO 3

EFEITO DA MATURAÇÃO DOS FRUTOS DE  
*ARBUTUS UNEDO* L. NA SUA COMPOSIÇÃO

### 3.1 Introdução

Nos tempos mais recentes, e de uma forma geral, a procura por frutos vermelhos, e em especial os silvestres, tem aumentado, não só pelas suas características organoléticas, mas sobretudo, pelo seu valor rico em promotores de saúde.

Ao longo do processo de amadurecimento (maturação) do fruto registam-se alterações ao nível do teor em alguns compostos fitoquímicos. Assim, são formados alguns compostos, enquanto o teor noutros diminui ou mesmo desaparece. Estas variações na composição e no teor de compostos fitoquímicos terão inevitavelmente repercussões ao nível da atividade antioxidante exibida pelos frutos.

Os medronhos são ricos em compostos que têm grande importância na atividade antioxidante, e dos quais se destacam os compostos fenólicos (antocianinas, proantocianinas, catequinas, flavonas, glicosídeos derivados de ácido gálico, taninos e flavonóides), vitaminas (E, C) e carotenóides (Ayaz *et al.*, 2000; Alarcão-e-Silva *et al.*, 2001; Pawlowska *et al.*, 2006; Pallauf *et al.*, 2008, Wang, 2010). Deste modo, uma dieta rica em frutas vermelhas, onde os medronhos se incluem, pode reduzir ou prevenir o aparecimento de doenças cardiovasculares, cancro e muitas outras doenças diretamente relacionadas com as espécies reativas de oxigénio (Pallauf *et al.*, 2008).

Alguns trabalhos relacionam a composição química e atividade antioxidante com a maturação dos frutos, em especial nos frutos vermelhos ou nos seus derivados como sumos (Wang & Lin, 2000; Jakobe *et al.*, 2007; Helbig *et al.*, 2008; Pallauf *et al.*, 2008; Ozgen *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2011a; Isbilir *et al.*, 2012). No caso do medronho, a informação sobre a evolução da maturação e sua influência ao nível da composição química e atividade antioxidante é escassa. Apenas, Oliveira *et al.* (2011a, b) avaliou a fração volátil, a composição química em ácidos gordos, vitamina E e a atividade antioxidante em três estados de maturação (verde, intermédio e maduro) do medronho. De uma maneira geral, os resultados obtidos por estes autores revelaram que o estado de maturação influenciava significativamente os parâmetros estudados. Por exemplo, na avaliação da fração volátil foi visível que a quantidade total de compostos voláteis diminuía à medida que a maturação dos frutos aumentava, sendo este comportamento visível em todos os grupos químicos presentes, com a exceção dos sesquiterpenos e monoterpenos (Oliveira *et al.* 2011b). Adicionalmente, foi observado que os compostos

responsáveis pelo cheiro verde característicos diminuía com o avanço da maturação, ao mesmo tempo que surgiam compostos com aromas doces e frutados, responsáveis pelo cheiro que os frutos, quando maduros, apresentam.

Neste capítulo avaliou-se a composição química e a atividade antioxidante de frutos de *A. unedo* que apresentavam seis índices de maturação diferentes (desde o verde ao maduro), identificados com base na sua coloração.

## 3.2 Material e Métodos

### 3.2.1. Amostras

Em outubro de 2011, foram colhidos frutos de *A. unedo* (Fig. 10) de 15 árvores selecionadas aleatoriamente, num povoamento florestal natural localizado à entrada de Vinhais perto da estrada N.103 (41°44'40.15"N 7°27'7.56"W). O material colhido foi colocado em sacos estéreis e transportado para o laboratório sob condições refrigeradas. No laboratório,



**Fig. 10.** Medronhos após colheita.

os frutos foram separados por seis índices de maturação de acordo com a sua coloração externa e da polpa do fruto (Fig. 11), tendo sido constituídos três lotes independentes por índice de maturação considerado. De cada lote foram retirados 10 frutos, para efetuar as medições da cor, e 20 frutos para as determinações a fresco, que foram armazenados no frigorífico a  $4\pm 2^\circ\text{C}$ . O restante material foi imediatamente congelado, liofilizado e acondicionado em tubos de *Falcon*, que permaneceram num local escuro e seco (exsicador) até à realização das análises.



**Fig. 11.** Índices de maturação considerados neste trabalho, de 1 a 6 como ilustrado.

### 3.2.2. Reagentes

A pastilha de catalisador (Kjetabs) com 5 g de sulfato de potássio e 0,5 g de sulfato de cobre II, BHT, trifluoreto de boro e 1,4-dioxano foram adquiridos à Sigma (Madrid, Espanha). O n-hexano de HPLC foi adquirido à Merck (Darmstadt, Alemanha). O Metanol e KOH foram adquiridos à Panreac (Espanha) e fornecido pela Sigma (Madrid, Espanha). Os restantes reagentes químicos foram obtidos na Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA).

### **3.2.3. Padrões**

O  $\alpha$ -tocoferol foi adquirido à Sigma (Espanha). Foi preparada uma solução padrão de 5 mg/mL em etanol e manteve-se a  $-20\pm 2^\circ\text{C}$ . A concentração exata foi avaliada por espectrofotometria UV, de acordo com a capacidade de absorção molar em etanol (Podda *et al.*, 1996). O  $\gamma$ -TTR (tocotrienol) foi obtido da Matreya (EUA) sendo usado apenas para fins de identificação. O tocol foi o padrão interno utilizado para a quantificação de vitamina E (2-metil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)6-cromanol), obtido a partir de Matreya. Inc. (PA, USA). Foi preparada uma solução de 100 g/mL em n-hexano e mantida a  $-20\pm 2^\circ\text{C}$ .

### **3.2.4. Humidade**

A determinação do teor em humidade foi efetuada segundo o método da AOAC 925,40 (1995), utilizando aproximadamente 5 g por amostra a  $100\pm 2^\circ\text{C}$  (Memmert Schwabach 854, 1994).

### **3.2.5. Proteína**

O teor de proteína bruta dos frutos foi determinado pelo método Kjeldahl de acordo com a metodologia descrita em AOAC (2000). Foi pesada 1 g de amostra para tubo de Kjeldahl, adicionada uma pastilha de catalisador (Kjetabs, com a composição de 5 g de sulfato de potássio e 0,5 g de sulfato de cobre II) e 15 mL ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado). A mineralização foi levada a cabo pelo bloco digestor, a uma temperatura de  $400\pm 50^\circ\text{C}$  até digestão completa das amostras. Após digestão, deixaram-se arrefecer as amostras que foram de seguida destiladas (Velp Scientifica UDK 152) com posterior titulação, obtendo-se assim os valores de proteína bruta através da multiplicação do azoto pelo factor de conversão 6,25. Os valores obtidos são expressos em percentagem de proteína bruta.

### **3.2.6. Cinzas**

O teor mineral dos frutos foi determinado segundo o método AOAC 920.93,12. Foram colocadas 0,5g de amostra liofilizada, em cadinhos a uma temperatura de  $500\pm 25^\circ\text{C}$ , na mufla (48000 Furnace, Thermolyne, USA) até se obterem as cinzas.

Depois de arrefecerem num exsiccador durante 30 minutos, os cadinhos foram pesados e foi calculado o teor mineral presente.

### **3.2.7 Gordura**

O teor em gordura total foi determinado por extração em Soxhlet de acordo com o método AOAC 948,22, usando éter de petróleo como solvente, com um tempo de extração mínimo de 24 h (AOAC, 2000).

### **3.2.8. Hidratos de carbono, fibras e valor energético**

O teor em hidratos de carbono e fibras foi estimado pela diferença dos outros componentes, utilizando a seguinte fórmula: conteúdo em hidratos de carbono = 100% - (% de humidade + % de proteína + % gordura + % de cinzas). A energia total foi calculada utilizando a seguinte equação: Energia (kcal) = 4 x (g de proteína + g hidratos de carbono) + 9 x (g lípidos).

### **3.2.8. Ácidos Gordos**

A avaliação do perfil em ácidos gordos foi determinada utilizando 500mg de amostra liofilizada, à qual se acrescentaram 20µl tocol (1mg/10mL), 50µl BHT (1mg/10mL) e 4mL de metanol com ligeira agitação. De seguida, acrescentaram-se 4mL de n-hexano e procedeu-se a nova agitação durante cerca de 30 minutos. Adicionaram-se 2mL de NaCl saturado, seguido de nova agitação e centrifugação. Posteriormente, foram retirados cerca de 4mL de solução para um vial, no qual foi adicionado 4mL de n-hexano, agitado e centrifugado. O solvente foi evaporado sob corrente de azoto (2x). A segunda evaporação efetuou-se até obter aproximadamente 2/3 de solução. À posteriori foi acrescentado sulfato de sódio anidro e procedeu-se a nova centrifugação.

#### ***Derivatização a quente (Ácidos Gordos):***

Retiraram-se cerca de 100µl da solução anterior a qual se levou à secura total em corrente de azoto. Quando totalmente seca, acrescentaram-se 1,5mL KOH (0,5 M/ MeOH), e levou-se à estufa a uma temperatura de 100°C±2°C, durante 10 minutos. No final, retirou-se e deixou-se arrefecer durante 5 minutos. Adicionaram-se 1,5mL de BF<sub>3</sub>

(hotte) e levou-se à estufa por mais 30 minutos. De seguida, deixou-se arrefecer e acrescentaram-se 2,5mL de NaCl a 1% e 2mL de Heptano, centrifugou-se a solução durante 5 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi recuperado, ao qual foi acrescentado sulfato de sódio anidro, mais uma vez foi retirado o sobrenadante, que foi levado a secar em corrente de azoto até obter cerca de ¼ da solução. A análise do perfil de ácidos gordos foi realizada num cromatógrafo (Chrompack CP 9001) (Chrompack, Middelburg, The Netherlands) com detetor FID com sistema de injeção automática (Chrompack CP-9050). As temperaturas do injetor e detetor foram 230 e 270°C, respetivamente. A separação dos compostos foi obtida utilizando uma coluna capilar de sílica com 50 m x 0.25 mm, revestida com um filme de 0.19 µm (CP-Sil 88 Chrompack). O gás utilizado para esta determinação foi o hélio a uma pressão de 120 kPa. A temperatura da coluna foi de 160°C durante 1 minuto, seguida de um aumento até aos 239°C, com uma taxa de aumento de 4°C/min durante 10 minutos.

### **3.2.9. Vitamina E**

O processo de extração utilizado foi igual ao descrito para os ácidos gordos, no ponto 3.2.8..

#### ***Curva Padrão de Tocoferóis:***

A curva padrão de tocoferóis foi executada utilizando uma solução mãe com 50 µl de α-tocoferol e 10µl de γ-TTR (tocotrienol), a qual se fez com n-hexano até um volume final de 1000µl, realizando-se de seguida diluições sucessivas. A curva e as amostras foram analisadas por HPLC. O cromatógrafo líquido era constituído por um sistema integrado Jasco (Japão), equipado com um injetor automático As-950, uma bomba (PU-980), um detetor de iodo (MD-910) e um detetor de fluorescência (FP-920) ( $\lambda_{exc}$ = 290 nm e  $\lambda_{em}$ = 330 nm) conectados em série. A separação dos compostos foi feita através de uma coluna Supelcosil (TM LC-SI (3µm)) 75x30mm (Supelco, Bellefonte, PA) trabalhando a uma temperatura constante de 21°C. O eluente utilizado para a corrida foi o n-hexano com 1,5% de 1,4-dioxano a 0,7 ml/min. Os resultados foram analisados no software controlador do PDA Borwin (JMBS, França). O α-tocoferol e γ-tocotrienol foram identificados por comparação dos cromatogramas com os padrões por co-eluição e por UV. A quantificação foi feita através do método de padrão interno, utilizando a resposta do sinal de fluorescência.

### 3.2.10. Cor

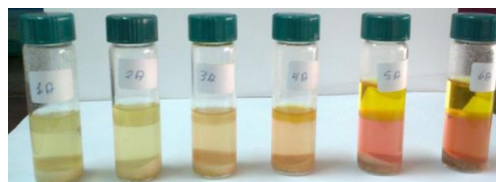
Para a determinação da cor foi utilizado um colorímetro Minolta CR-400, no modo CIELAB, avaliando-se as coordenadas L\*, a\* e b\* em que L\* varia entre 0 (totalmente preto) e 100 (totalmente branco), a\* entre -80 (verde) e +100 (vermelho), e b\* entre -50 (azul) e +70 (amarelo). Para tal foram utilizados 10 frutos em diferentes índices de maturação (Fig. 12).



**Fig. 12.** Frutos de *Arbutus unedo* em diferentes estados de maturação.

### 3.2.10. Carotenóides

O teor em carotenóides foi determinado pelo método descrito por Nagata & Yamashita (1992), em gelo, utilizando 1g de amostra liofilizada à qual foram acrescentados 10 mL de uma mistura de acetona-hexano (4:6) (Fig. 13), que se levou a agitar durante 30 minutos.

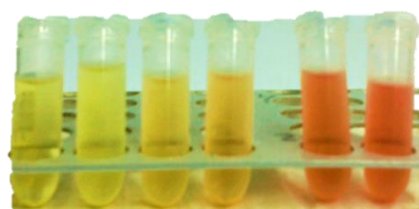


**Fig. 13.** Extratos de medronhos em diferentes estados de maturação para leitura de carotenóides.

De seguida foram retirados 2 mL de sobrenadante da solução para um eppendorf que se levou a centrifugar a 1300 rpm durante 4 minutos, 1mL de sobrenadante foi retirado para um tubo de Falcon ao qual se acrescentaram 4 mL de hexano. A absorvância do produto de extração foi medida a 453, 505, 645 e 663 nm (Thermo, Genesys 10uv). O conteúdo em  $\beta$ -caroteno foi calculado de acordo com a equação:  $\beta$ -caroteno (mg/100 mL) =  $0.216 \times A_{663} - 1.220 \times A_{645} - 0.304 \times A_{505} + 0.452 \times A_{453}$ . Os resultados foram expressos em mg/100g de peso seco.

### 3.2.11. Antocianinas

O extrato para a identificação e quantificação das antocianinas presentes no fruto foi obtido utilizando 250 mg de amostra liofilizada, à qual se adicionaram 5 mL de metanol acidificado (0,1% HCl) A amostra sofreu



**Fig. 14.** Extratos de medronhos em diferentes estados de maturação para análise de antocianinas.

agitação durante 10 min, seguida de uma centrifugação a 1300 rpm. Ao sobrenadante foram adicionados novamente 5 mL de metanol acidificado (0,1% HCl), repetindo-se todo o processo, obtendo-se o resultado observado na Fig. 14.

A análise cromatográfica foi realizada numa unidade analítica de HPLC-DAD (Jasco, Tóquio, Japão) equipada com bombas de HPLC Jasco PU-2080, um detetor MP-2010 de díodos, com múltiplos comprimentos de onda e um injetor Rheodyne 7725i com *loop* de 20 uL. Foi utilizada uma coluna ACE C18 (5µm; 250mm de comprimento; 4,6mm de diâmetro interno). Um controlador de software Borwin PDA (JMBS Developments, Le Fontanil, França) foi utilizado para detecção e processamento dos dados da absorvância do HPLC.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando ácido fórmico a 10% (eluente A) e ácido fórmico/água/metanol (10:40:50 v/v/v, eluente B). O programa de gradiente utilizado para a separação das antocianinas foi 0-5 min, 10% do eluente B em A; 5-7,5 min, 10-25% do eluente B em A, mantendo a proporção durante 5 min; 12.5-30 min, 25-75% de B em A; 30-40 min, 75-10% de B em A, e 40-45 min, 10% de B em A para a coluna de enxaguamento e reequilíbrio. A detecção das antocianinas foi realizada a 520 nm, com um fluxo de 1,0 mL/min. A separação das antocianinas foi efetuada à temperatura ambiente.

### ***Quantificação de Antocianinas***

A quantificação das antocianinas presentes nos frutos de *A. unedo* foi realizada por um método de calibração externa, com padrões de antocianinas comerciais, que foram diluídos em metanol (Amaro *et al.*, 2012). A quantidade de antocianinas presente foi expressa em mg/100 g de medronho.

### **3.2.12. Atividade antioxidante**

Para a avaliação da atividade antioxidante dos medronhos utilizou-se a metodologia anteriormente descrita no capítulo 2, ponto 2.2.4.

### **3.2.13. Análise estatística**

Para cada amostra, foram realizadas três extrações independentes e todas em duplicado. Os resultados estão representados pela média dos valores e desvio padrão.

As diferenças entre as amostras, em cada parâmetro, foram estudadas usando uma análise de variância one-way (ANOVA), seguidas pelo teste de Tukey HSD com  $\alpha = 0,05$  ou Dunnett. Este tratamento foi realizado usando o software SPSS 17. A análise de componentes principais foi efectuada com o mesmo software.

### 3.3. Resultados e Discussão

#### 3.3.1 Avaliação nutricional

Na Tabela 4, apresentam-se os resultados relativos à análise da composição nutricional de frutos de *A. unedo* nos diferentes índices de maturação (IM) no que respeita à humidade, gordura, proteína bruta, cinzas, hidratos de carbono e valor energético. A água demonstrou ser o componente maioritário dos frutos nos diferentes estados de maturação, tendo variado o seu teor entre 58,9 e 46,9%. Valores de humidade em frutos de *A. unedo* na ordem dos 56,6% foram igualmente descritos anteriormente por diversos investigadores (Özcan & Haciseferoğullari, 2007; Barros *et al.*, 2010; Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2011). Verificou-se ainda que o teor em humidade variou de acordo com o estado de maturação dos frutos. Foi registado um aumento do teor em água do IM 1 para os IM 2, 3 e 4, onde permaneceu praticamente constante (por volta dos 58%), seguido por uma diminuição atingindo o menor valor no IM 6 (46,94±1,92%) que se verificou ser estatisticamente significativo face aos restantes IM analisados.

**Tabela 4** Composição nutricional de frutos de *Arbutus unedo* L. (média ± desvio padrão), por 100g de amostra fresca, de acordo com o estado de maturação.

	Índice de maturação (IM)						p	R <sup>2</sup>
	1	2	3	4	5	6		
<b>Humidade (g)</b>	53,9±1,24 <sup>b</sup>	58,9 ± 2,41 <sup>b</sup>	58,5 ± 2,98 <sup>b</sup>	58,6 ± 2,08 <sup>b</sup>	54,2 ± 0,81 <sup>b</sup>	46,9 ± 1,92 <sup>a</sup>	**	0,321
<b>Gordura(g)</b>	0,65 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,58 ± 0,14 <sup>a,b</sup>	0,49 ± 0,07 <sup>a,b</sup>	0,52 ± 0,12 <sup>a,b</sup>	0,52 ± 0,11 <sup>a,b</sup>	0,46 ± 0,01 <sup>a</sup>	**	0,418
<b>Proteína Bruta (g)</b>	3,51 ± 0,14 <sup>d</sup>	2,69 ± 0,24 <sup>c</sup>	1,39 ± 0,23 <sup>a</sup>	2,19 ± 0,24 <sup>b,c</sup>	2,35 ± 0,10 <sup>b,c</sup>	1,97 ± 0,23 <sup>b</sup>	**	0,319
<b>Cinzas (g)</b>	2,27 ± 0,21 <sup>d</sup>	1,89 ± 0,18 <sup>a-f</sup>	1,73 ± 0,05 <sup>a-c</sup>	1,71 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,97 ± 0,05 <sup>c,d</sup>	2,07 ± 0,08 <sup>d</sup>	n.s	0,027
<b>Hidratos de carbono (g)</b>	38,98±1,49 <sup>a</sup>	35,91±2,27 <sup>a</sup>	37,95±3,14 <sup>a</sup>	37,11±1,90 <sup>a</sup>	40,88±0,70 <sup>a</sup>	48,55±2,04 <sup>b</sup>	**	0,459
<b>Valor energético (Kcal)</b>	175,33±5,00 <sup>a</sup>	159,47±9,30 <sup>a</sup>	161,67±12,38 <sup>a</sup>	161,66±7,85 <sup>a</sup>	177,60±3,46 <sup>a</sup>	205,93±7,75 <sup>b</sup>	*	0,339

<sup>a-f</sup> em cada linha valores médios com diferentes letras diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

n.s  $p > 0,05$  – correlação não significativa; \*  $p \leq 0,05$  – correlação significativa; \*\*  $p \leq 0,01$  – correlação muito significativa.

O teor em gordura nos frutos variou igualmente de acordo com o índice de maturação entre 0,65 e 0,46 g/100 g massa fresca (Tabela 4). Os valores obtidos são similares aos referenciados anteriormente por outros autores (Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2011). Os níveis mais elevados foram observados nos frutos com um IM 1 (0,65±0,03 g/100g de amostra) e diminuíram gradualmente com a maturação do fruto, atingindo o valor mínimo nos frutos com um IM 6 que revelou ser estatisticamente significativo face ao IM 1. A existência de uma correlação entre os teores de gordura e os índices de maturação dos frutos ( $R^2=0,418$ ;  $p<0,01$ ) reforça os resultados descritos.

No que concerne à proteína bruta, os valores oscilaram entre 3,51 e 1,39 g/100g de amostra e na sua generalidade verificou-se ser variável de acordo com estado de maturação do fruto (Tabela 5). Os frutos com IM 1 foram os que apresentaram valores significativamente superiores em proteína (3,51±0,14 g/100g de amostra), seguidos pelos frutos com IM 2, 5 e 4 que revelaram ter quantidades muito similares entre si, a variar entre 2,69 e 2,19 g/100g de amostra. Por sua vez, os níveis de proteína mais baixos foram observados nos frutos com IM 3 (1,39±0,23 g/100g de amostra) seguido do IM 6 (1,97±0,23 g/100g de amostra). Os resultados obtidos estão de acordo com o referenciado por Alarcão-e-Silva *et al.*,(2001) que observaram teores de proteína superiores em medronhos verdes face aos maduros.

Relativamente aos teores em cinzas nos frutos verificou-se que, apesar de haver variações significativas ( $p\leq 0,001$ ) entre os diferentes estados de maturação, os dois parâmetros não se correlacionam linearmente entre si (Tabela 5). De facto, as cinzas foram superiores nos IM extremos, quer no inferior, IM 1 com  $2,27 \pm 0,21$  g/100g de amostra, quer no superior, IM 6 com  $2,07 \pm 0,08$  g/100g de amostra. Valores de cinzas similares aos encontrados no presente trabalho foram anteriormente referenciadas por diversos autores em medronhos (Özcan & Haciseferoğullari, 2007; Barros *et al.*, 2010).

Quer o teor em hidratos de carbono, como o valor energético, mostraram ter uma tendência linear com o estado de maturação do fruto (Tabela 5). Ambos os parâmetros aumentaram com a maturação do fruto, o que seria de esperar visto que ao longo da maturação o conteúdo em açúcares também aumenta. Os teores em hidratos de carbono foram significativamente superiores em frutos com IM 6 (48,48±1,98%) face aos restantes IM, que apresentaram valores muito similares a variar entre 40,87 e 35,86%. Os resultados relativos ao valor energético são concordantes com os resultados dos

hidratos de carbono, tendo-se verificado serem os frutos com IM 6 aqueles que possuem um maior valor energético ( $205,93 \pm 7,75$  Kcal/100g). Os resultados obtidos no presente estudo relativos aos teores de hidratos de carbono e valor energético de medronhos são similares aos referenciados anteriormente por diversos autores (Ayaz *et al.*, 2000; Barros *et al.*, 2010; Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2011).

### 3.3.2 Ácidos gordos

Na Tabela 5 encontra-se indicado o perfil de ácidos gordos, determinado nos seis índices de maturação considerados. Apresenta-se também o agrupamento dos diferentes ácidos gordos nas três classes principais, nomeadamente ácidos gordos saturados (SFA), ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e ácidos gordos polinsaturados (PUFA). No total, foram identificados 17 ácidos gordos, com destaque para o ácido  $\alpha$ -linolénico ( $C_{18:3n3}$ ), que foi o maioritário variando entre  $41,56 \pm 1,36\%$  (IM 1) e  $49,69 \pm 1,38\%$  (IM 2), não tendo sido detectada nenhuma tendência constante entre o seu teor e a maturação do fruto. Seguiu-se o ácido linoleico ( $C_{18:2cc}$ ) cujos valores variaram entre  $25,36 \pm 0,79\%$  (IM 3) e  $26,84 \pm 0,65\%$  (IM 6). Também neste caso não se verificou uma tendência linear entre os diferentes índices de maturação. O terceiro ácido gordo maioritário foi o ácido palmítico ( $C_{16:0}$ ), com valores a variar entre o máximo de  $12,13 \pm 0,76\%$  (IM 1) e o mínimo de  $10,04 \pm 0,20\%$  (IM 5), não tendo sido detectada uma tendência com o índice de maturação.

**Tabela 5.** Composição em ácidos gordos de frutos de *Arbutus unedo* L. com diferentes índices de maturação (percentagem média  $\pm$  desvio padrão). SFA-Ácidos gordos saturados; MUFA- Ácidos gordos monoinsaturados; PUFA- Ácidos gordos polinsaturados.

	Índice de maturação (IM)						<i>p</i>	R <sup>2</sup>
	1	2	3	4	5	6		
<b>C12:0</b>	0,67 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	0,77 $\pm$ 0,09 <sup>a-c</sup>	0,69 $\pm$ 0,04 <sup>a,b</sup>	0,92 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>	0,93 $\pm$ 0,13 <sup>c</sup>	0,87 $\pm$ 0,13 <sup>b,c</sup>	***	0,298
<b>C14:0</b>	1,43 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	1,47 $\pm$ 0,15 <sup>a,b</sup>	1,64 $\pm$ 0,13 <sup>b,c</sup>	1,74 $\pm$ 0,13 <sup>c,d</sup>	1,87 $\pm$ 0,10 <sup>d,e</sup>	1,98 $\pm$ 0,06 <sup>e</sup>	***	0,729
<b>C15:0</b>	0,02 $\pm$ 0,05 <sup>a,b</sup>	0,08 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,03 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,07 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,07 $\pm$ 0,02 <sup>a,b</sup>	0,06 $\pm$ 0,03 <sup>a,b</sup>	n.s.	0,087
<b>C16:0</b>	12,13 $\pm$ 0,76 <sup>c</sup>	10,33 $\pm$ 0,49 <sup>a,b</sup>	11,13 $\pm$ 1,12 <sup>a-c</sup>	10,62 $\pm$ 0,49 <sup>a,b</sup>	10,04 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	11,31 $\pm$ 0,56 <sup>b,c</sup>	n.s.	0,102
<b>C16:1n9</b>	n.q.	0,10 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,11 $\pm$ 0,01 <sup>a,b</sup>	0,12 $\pm$ 0,03 <sup>a,b</sup>	0,10 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,14 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	***	0,447
<b>C16:1n7</b>	0,54 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>	0,22 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,25 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	0,25 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,21 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,24 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	***	0,311
<b>C18:0</b>	6,13 $\pm$ 0,15 <sup>f</sup>	5,52 $\pm$ 0,09 <sup>b,d</sup>	6,34 $\pm$ 0,52 <sup>d-f</sup>	5,06 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	5,79 $\pm$ 0,14 <sup>c,e</sup>	5,37 $\pm$ 0,23 <sup>a-c</sup>	*	0,188
<b>C18:1n9</b>	8,63 $\pm$ 0,54 <sup>b</sup>	6,41 $\pm$ 0,68 <sup>b</sup>	7,68 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	6,33 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>	6,30 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	6,25 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>	***	0,432
<b>C18:2cc</b>	26,49 $\pm$ 0,22 <sup>a,b</sup>	25,79 $\pm$ 0,45 <sup>a,b</sup>	25,36 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>	25,93 $\pm$ 0,34 <sup>a,b</sup>	26,47 $\pm$ 0,31 <sup>a,b</sup>	26,84 $\pm$ 0,65 <sup>b</sup>	n.s.	0,045
<b>C20:0</b>	0,53 $\pm$ 0,25 <sup>a,b</sup>	0,68 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	0,14 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,14 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,13 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,13 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	***	0,528
<b>C18:3n6</b>	0,25 $\pm$ 0,19	0,38 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,04	0,40 $\pm$ 0,08	0,37 $\pm$ 0,03	0,39 $\pm$ 0,05	n.s.	0,044
<b>C18:3n3</b>	41,56 $\pm$ 1,36 <sup>a</sup>	49,69 $\pm$ 1,38 <sup>c</sup>	43,50 $\pm$ 1,52 <sup>a,b</sup>	45,51 $\pm$ 0,91 <sup>b,c</sup>	44,92 $\pm$ 0,45 <sup>b,c</sup>	43,67 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	n.s.	0,002
<b>C20:1n9</b>	0,86 $\pm$ 0,41	1,11 $\pm$ 0,08	1,16 $\pm$ 0,18	1,05 $\pm$ 0,17	1,01 $\pm$ 0,09	0,98 $\pm$ 0,16	n.s.	0,001
<b>C20:2</b>	n.q.	0,02 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,19 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>	0,18 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	0,11 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,15 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	***	0,438
<b>C22:0</b>	0,16 $\pm$ 0,23 <sup>a,b</sup>	0,16 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	0,01 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,02 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	n.q.	n.q.	***	0,315
<b>C22:1n9</b>	n.q.	0,03 $\pm$ 0,03 <sup>a,b</sup>	1,01 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	1,24 $\pm$ 0,19 <sup>a,b</sup>	1,43 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	1,37 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>	***	0,695
<b>C24:0</b>	0,27 $\pm$ 0,17	0,26 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,05	0,30 $\pm$ 0,06	0,23 $\pm$ 0,03	0,26 $\pm$ 0,06	n.s.	0,013
<b>SFA</b>	20,97 $\pm$ 1,02 <sup>c</sup>	19,26 $\pm$ 2,86 <sup>a,b</sup>	20,25 $\pm$ 1,08 <sup>b,c</sup>	18,87 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>	19,06 $\pm$ 0,15 <sup>a,b</sup>	19,98 $\pm$ 0,66 <sup>a-c</sup>	n.s.	0,143
<b>MUFA</b>	10,03 $\pm$ 0,85 <sup>b</sup>	7,84 $\pm$ 1,76 <sup>a</sup>	9,20 $\pm$ 0,37 <sup>b</sup>	7,75 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup>	7,62 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup>	7,62 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>	n.s.	0,402
<b>PUFA</b>	68,48 $\pm$ 1,84 <sup>a</sup>	72,91 $\pm$ 4,54 <sup>c</sup>	70,46 $\pm$ 1,25 <sup>b</sup>	73,26 $\pm$ 0,90 <sup>c</sup>	73,31 $\pm$ 0,46 <sup>c</sup>	72,41 $\pm$ 0,36 <sup>c</sup>	n.s.	0,282

<sup>a-f</sup>- em cada linha valores médios com diferentes letras diferem significativamente ( $p < 0,05$ ), n.q. – não quantificável.

n.s  $p > 0,05$  – correlação não significativa; \*  $p \leq 0,05$  – correlação significativa; \*\*\*  $p \leq 0,001$  correlação extremamente significativa.

Os ácidos oleico ( $C_{18:1n9}$ ), esteárico ( $C_{18:0}$ ) e merístico ( $C_{14:0}$ ) mostraram ter uma participação importante na composição total de ácidos gordos, variando os seus valores respectivamente entre 8,63% (IM 1) e 6,2%5 (IM 6), 6,34% (IM 3) e 5,06% (IM 4), 1,98% (IM 6) e 1,43% (IM 1) (Tabela 5). É de salientar ainda que, de entre os ácidos gordos identificados, o ácido merístico foi o único onde se verificou uma forte correlação entre o seu teor e a maturação do fruto ( $R^2=0,729$ ;  $p\leq 0,001$ ). No que respeita aos restantes ácidos gordos, a sua posição relativa foi inferior a 1%. No entanto, apesar da sua reduzida importância relativa, não deverão ser descurados os seus teores uma vez que podem ser indicadores da evolução da maturação do fruto. Neste âmbito são de salientar o  $C_{16:1n9}$ ,  $C_{20:2}$ ,  $C_{22:1n9}$  e  $C_{22:0}$ , que no início do processo de maturação (IM 1) três deles não foram detetados ( $C_{16:1n9}$ ;  $C_{20:2}$ ;  $C_{22:1n9}$ ), aumentando ligeiramente ao longo da maturação. No entanto, para o caso do  $C_{22:0}$ , observou-se uma situação inversa, existindo nos primeiros estados de maturação e não sendo observado nos índices de maturação mais avançados (IM 5 e 6).

Na Tabela 5 é ainda apresentada a correlação entre o índice de maturação e a composição em ácidos gordos. Foi possível constatar que, para além do  $C_{14:0}$  atrás mencionado, os ácidos gordos  $C_{12:0}$ ;  $C_{16:1n9}$ ;  $C_{16:1n7}$ ;  $C_{18:1n9}$ ;  $C_{20:0}$ ;  $C_{20:2}$ ;  $C_{22:1n9}$  e  $C_{22:0}$  apresentam uma correlação extremamente significativa ( $p<0,001$ ). De igual modo, quando se realiza a análise de variância pelo teste ANOVA one-way e após se ter verificado os pressupostos de normalidade e de homogeneidade de variâncias, verifica-se que todos os ácidos gordos, à exceção do  $C_{20:1n9}$ ;  $C_{24:0}$ ;  $C_{16:1n7}$ ;  $C_{18:2cc}$ ;  $C_{18:3n6}$ ;  $C_{16:1n9}$ ;  $C_{22:0}$  e  $C_{22:1n9}$ , apresentam diferenças muito significativas ( $p<0,001$ ).

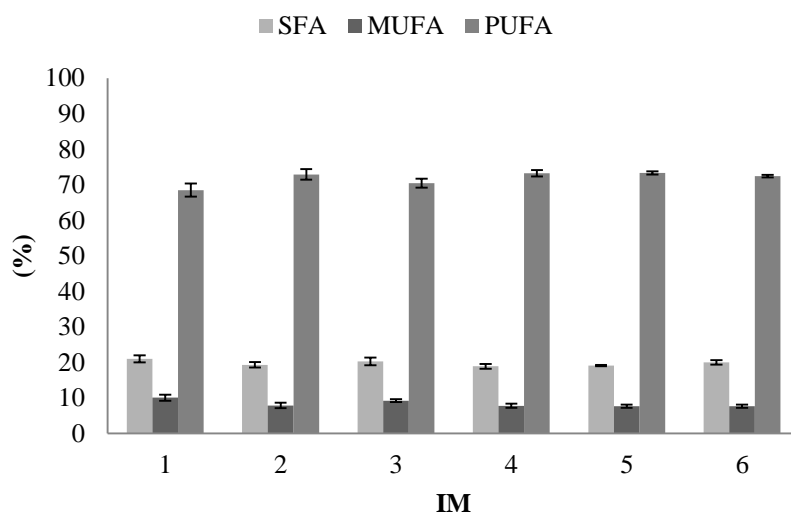
Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a composição em ácidos gordos foi semelhante ao reportado por outros autores (Helbig *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2011a). Contudo, é de assinalar que enquanto no presente trabalho foi avaliado o perfil em ácidos gordos do fruto os trabalhos referidos reportavam-se ao perfil de ácidos gordos das sementes (que estão dentro do fruto).

Do ponto de vista de qualidade da gordura, podemos afirmar que a ingestão de medronhos poderá ter interesse nutricional, uma vez que é um fruto que, apesar do seu reduzido teor em gordura, esta é rica em ácidos gordos ómega 3 ( $C_{18:3n3}$ ), representando cerca de 40-50% da gordura total. Sendo este um ácido gordo essencial, não sintetizado pelo organismo humano, existe a necessidade de o obter através alimentação. Apesar

deste ácido gordo ser bastante suscetível à oxidação, no caso dos medronhos este facto poderá não se verificar, uma vez que a quantidade de gordura é reduzida. A presença de vitamina E nos frutos, para além de o enriquecer nutricionalmente, poderá adicionalmente funcionar como forma de proteção à oxidação.

No que respeita ao agrupamento dos ácidos gordos em diferentes classes (Fig. 15), verificou-se que o teor em PUFA representou a maior fração lipídica, com  $73,31 \pm 0,46\%$  do total de ácidos gordos. Os SFA apresentaram uma quantidade considerável, praticamente constante nos três primeiros estados de maturação ( $20,97 \pm 1,02\%$ ,  $19,26 \pm 2,86\%$ ,  $20,25 \pm 1,08\%$ ), diminuindo nos três estados seguintes onde se mantiveram similares entre si ( $18,87 \pm 0,68\%$ ,  $19,06 \pm 0,15\%$ ,  $19,98 \pm 0,66\%$ ). Os MUFA estiveram presentes em menor quantidade  $7,62 \pm 0,43\%$  (IM 5) não ultrapassando os 10% em nenhum dos estados de maturação.

Os resultados obtidos estão de acordo com os reportados por outros autores (Oliveira *et al.*, 2011a; Helbig *et al.*, 2008; Barros *et al.*, 2010).

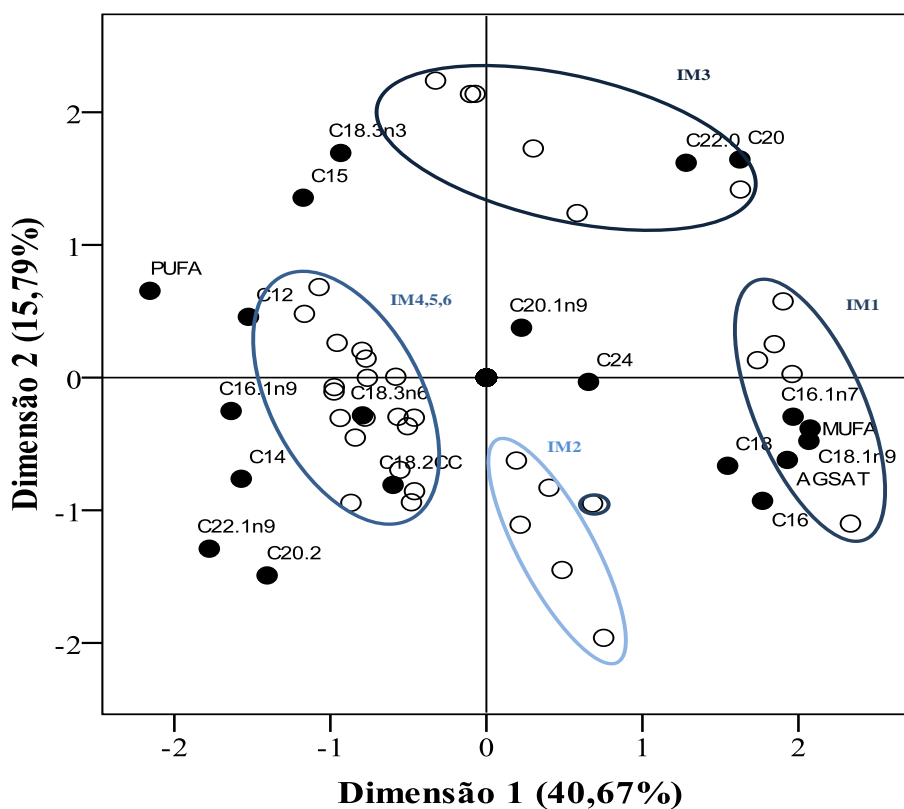


**Fig. 15.** Agrupamento em classes SFA, MUFA, PUFA de frutos de *Arbutus unedo* L. com diferentes índices de maturação (percentagem média  $\pm$  desvio padrão).

A aplicação da Análise de Componentes Principais (ACP) aos resultados do perfil em ácidos gordos, permitiu explicar 56,46% da variância dos casos, sendo 40,67% justificado pela primeira dimensão e 15,79% pela segunda dimensão (Fig. 16).

Através da análise da ACP podemos verificar que os índices de maturação agrupam-se em quatro grupos. No eixo positivo da primeira dimensão, surgem os

índices de maturação 1, 2 e 3, e os SFA e MUFA são os ácidos gordos maioritários, principalmente no IM 1. O IM 3 distingue-se por ter o maior teor em  $C_{22:0}$  e  $C_{18:3n3}$ . Na parte negativa da primeira dimensão encontramos os IM 4, 5 e 6 aparecendo os PUFA em maior quantidade.



**Fig. 16** Análise de componentes principais, utilizando os resultados do perfil em ácidos gordos de frutos de *Arbutus unedo* com diferentes índices de maturação. Os factores da PCA explicam 56,46% da variância total.

### 3.3.3. Vitamina E

Os resultados da avaliação do teor em vitamina E nos medronhos com diferentes índices de maturação podem ser visualizados na Tabela 6. Foram identificadas e quantificadas dois vitameros, o  $\alpha$ -tocoferol e o  $\gamma$ -tocotrienol, sendo que em todas as amostras estudadas o primeiro foi o maioritário representando mais de 90% do total quantificado. O maior teor em Vitamina E foi obtido nos frutos no IM 2 ( $23,38 \pm 0,79$  mg/100g) enquanto que o menor teor foi observado nos frutos no IM 4 ( $17,50 \pm 1,16$  mg/100g). Os teores de  $\alpha$ -tocoferol variaram entre  $16,46 \pm 1,15$  mg/100g (IM 4) e

22,03±0,69 mg/100g (IM 2). Os valores  $\gamma$ -tocotrienol nos frutos de *A. unedo* foram, comparativamente aos de  $\alpha$ -tocoferol, muito inferiores rondando entre 1mg/100g, sendo o valor mais baixo registado no IM 4 (1,04±0,03 mg/100g) e o mais elevado no IM 5 (1,53±0,11 mg/100g). Os teores observados são concordantes com os obtidos por Barros *et al.* (2010) e superiores aos apresentados por Pallauf *et al.* (2008).

De uma maneira geral verifica-se ainda uma tendência na diminuição do teor total em vitamina E com a maturação do fruto, devida sobretudo à diminuição do  $\alpha$ -tocoferol (Tabela 6).

**Tabela 6.** Composição em tocoferol e tocotrienol (mg/100g de ps) de frutos de *Arbutus unedo* L. em diferentes índices de maturação. Os valores são apresentados em percentagem (média  $\pm$ desvio padrão).

	Índice de maturação (IM)						P	R <sup>2</sup>
	1	2	3	4	5	6		
$\alpha$ - tocoferol	21,10±2,47 <sup>b,c</sup>	22,03±0,69 <sup>d</sup>	20,0±2,00 <sup>a-c</sup>	16,46±1,15 <sup>a</sup>	19,79±1,09 <sup>c</sup>	16,96±0,64 <sup>a,b</sup>	**	0,379
$\gamma$ - tocotrienol	1,30±0,19 <sup>a-c</sup>	1,35±0,16 <sup>b,c</sup>	1,18±0,15 <sup>a,b</sup>	1,04±0,03 <sup>a</sup>	1,53±0,11 <sup>c</sup>	1,30±0,08 <sup>b</sup>	n.s	0,010
<b>Total</b>	22,40±2,67 <sup>bc</sup>	23,38±0,79 <sup>c</sup>	21,22±2,14 <sup>a-c</sup>	17,50±1,16 <sup>a</sup>	21,32±1,19 <sup>c</sup>	18,26±0,71 <sup>a,b</sup>	**	0,335

<sup>a-d</sup> - em cada linha valores médios com diferentes letras diferem significativamente ( $P < 0,05$ ).  
n.s  $p > 0,05$  – correlação não significativa; \*\*  $p \leq 0,01$  – correlação muito significativa.

### 3.3.4. Cor

Nas Tabelas 8 e 9 são apresentadas as características da cor externa e interna dos frutos de *A. unedo*, respetivamente. Para cada índice de maturação foram realizadas 10 leituras, em triplicado de zonas diferentes do fruto (Fig. 17), para garantir que a leitura efectuada fosse representativa da cor do fruto.



**Fig. 17.** Índices de maturação onde foram realizadas as leituras da cor

Sendo assim, e no que diz respeito à cor, evidenciam-se diferenças altamente significativas ( $p < 0,001$ ) em todos os parâmetros de cor avaliados com o índice de maturação do fruto (Tabela 7). Esta avaliação vem confirmar a percepção visual. Assim pode verificar-se um aumento do parâmetro  $a^*$ , de verde ( $-13,37 \pm 1,78$ ) a vermelho ( $34,59 \pm 5,96$ ), ao mesmo tempo que se verifica uma diminuição de  $b^*$ , de  $53,42 \pm 3,27$  a  $17,28 \pm 4,39$  sempre na gama do amarelo, observando-se também que ao longo da maturação a cor muda de amarelo a vermelho. No que respeita à luminosidade  $L^*$ , e como esperado, esta vai diminuindo ao longo da maturação, apresentando uma cor mais clara no IM 1 ( $53,87 \pm 2,27$ ) e uma cor significativamente mais escura no IM 6 ( $20,14 \pm 3,80$ ).

**Tabela 7.** Características da cor externa pelo método CIELAB da evolução da cor de acordo com o índice de maturação em frutos de *Arbutus unedo* L. (média ± desvio padrão).

Índice de maturação (IM)								
	1	2	3	4	5	6	p	R <sup>2</sup>
<b>L*</b>	53,87±2,27 <sup>d</sup>	64,10±2,54 <sup>f</sup>	57,91±4,84 <sup>e</sup>	45,39±3,67 <sup>c</sup>	33,75±2,53 <sup>b</sup>	20,14±3,80 <sup>a</sup>	***	0,747
<b>a*</b>	-13,37±1,78 <sup>a</sup>	1,27±5,44 <sup>b</sup>	22,19±6,68 <sup>c</sup>	38,39±2,94 <sup>e</sup>	48,10±2,96 <sup>f</sup>	34,59±5,96 <sup>d</sup>	***	0,770
<b>b*</b>	53,42±3,27 <sup>c</sup>	66,36±3,90 <sup>d</sup>	59,82±7,48 <sup>e</sup>	50,31±4,75 <sup>c</sup>	36,49±3,70 <sup>b</sup>	17,28±4,39 <sup>a</sup>	***	0,651

<sup>a-f</sup> - em cada linha valores médios com diferentes letras diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

\*\*\*  $p \leq 0,001$  correlação extremamente significativa.

Similarmente, a cor no interior dos frutos seguiu a mesma evolução da cor do exterior (Tabela 8). No entanto, a gama de valores no interior dos frutos foi menor, variando para a\* de -6,73±2,67 a 12,25±2,32, para b\* de 51,00±3,75 a 42,26±7,52 e para a luminosidade L\* de 56,53±4,32 a 46,05±5,55.

Como seria de esperar, os frutos apresentam uma cor mais acentuada na parte exterior, tendência que se poderá justificar pela exposição solar e pela menor hidratação na película protetora.

**Tabela 8.** Característica da cor interna pelo método CIELAB da evolução da cor de acordo com o índice de maturação em frutos de *Arbutus unedo* L. (média ± desvio padrão).

Índice de maturação (IM)								
	1	2	3	4	5	6	p	R <sup>2</sup>
<b>L*</b>	56,53±4,32 <sup>c</sup>	62,70±4,63 <sup>d</sup>	59,81±4,19 <sup>c,d</sup>	53,22±3,40 <sup>b</sup>	50,81±3,35 <sup>b</sup>	46,05±5,55 <sup>a</sup>	***	0,439
<b>a*</b>	-6,73±2,67 <sup>a</sup>	-0,97±4,83 <sup>b</sup>	7,47±4,99 <sup>c</sup>	10,75±4,64 <sup>c,d</sup>	11,54±3,38 <sup>d</sup>	12,25±2,32 <sup>d</sup>	***	0,673
<b>b*</b>	51,00±3,75 <sup>b</sup>	58,48±3,68 <sup>c</sup>	59,20±4,18 <sup>c</sup>	53,42±4,07 <sup>b</sup>	50,31±5,96 <sup>b</sup>	42,26±7,52 <sup>a</sup>	***	0,229

<sup>a-c</sup> - em cada linha valores médios com diferentes letras diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

\*\*\*  $p \leq 0,001$  correlação extremamente significativa.

### 3.3.5. Estimativa de $\beta$ -caroteno

O resultado relativo à quantidade de  $\beta$ -caroteno presente nos medronhos em diferentes índices de maturação encontra-se indicado na Tabela 9. Verificou-se que o teor em  $\beta$ -caroteno aumentou até ao IM 3 (4,99±0,52 mg/100g), diminuindo significativamente até ao IM 6 (3,74±0,06 mg/100g). O IM 3 foi o índice de transição das cores amarelo-alaranjado para as vermelhas. Uma vez que a cor amarela vai dando

lugar à cor vermelha, seria de esperar que esta tendência se verificasse e que a quantidade de  $\beta$ -caroteno aumentasse e de seguida diminuísse.

**Tabela 9.** Composição em  $\beta$ -caroteno (mg /100g) em frutos de *Arbutus unedo* L. (média  $\pm$  desvio padrão) com diferentes índices de maturação.

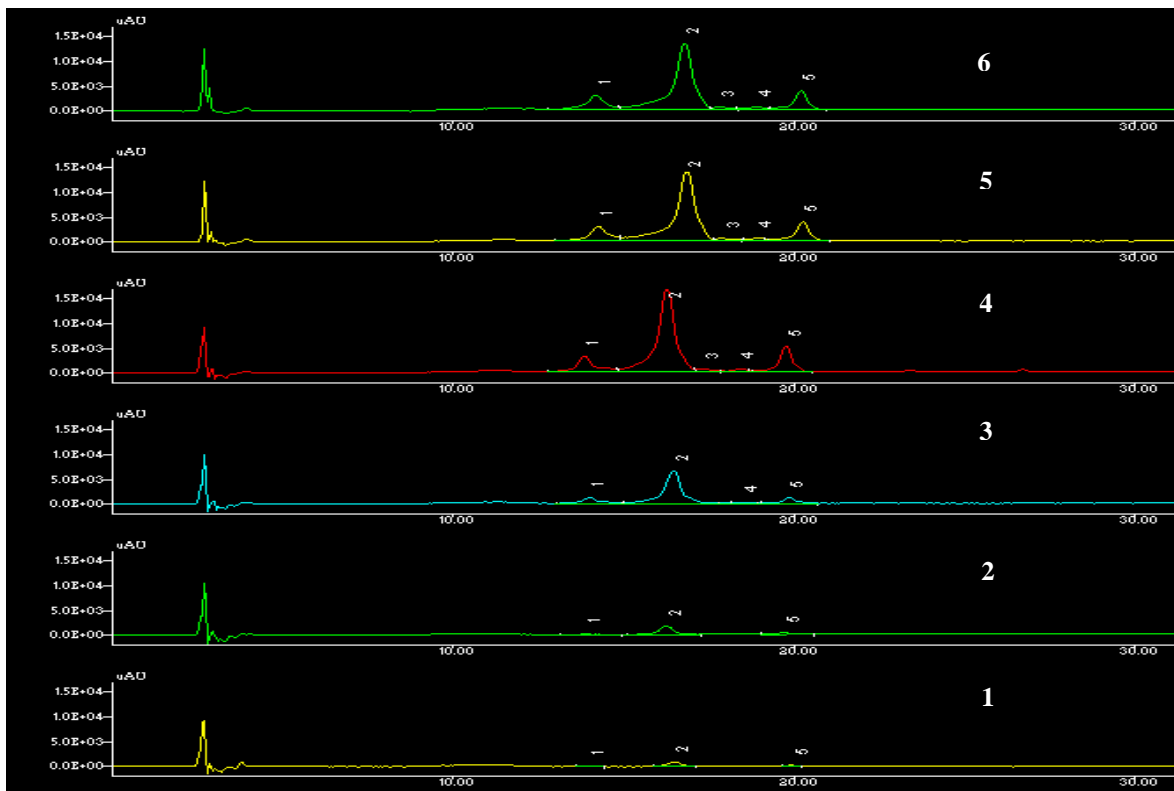
	Índice de maturação (IM)						p	R <sup>2</sup>
	1	2	3	4	5	6		
<b><math>\beta</math>-caroteno</b>	4,28 $\pm$ 0,35 <sup>a,b</sup>	4,64 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	4,99 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup>	4,09 $\pm$ 0,33 <sup>a,b</sup>	4,74 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup>	3,74 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	n.s.	0,050

<sup>a-b</sup> - em cada linha valores médios com diferentes letras diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).  
n.s  $p > 0,05$  – correlação não significativa; \*\*\*  $p \leq 0,001$  correlação extremamente significativa

### 3.3.6. Antocianinas

No que concerne ao teor total de antocianinas (Tabela 10), verificou-se que aumentou significativamente ao longo da maturação dos frutos desde o IM 1 (0,63 $\pm$ 0,20 mg/100g) até o IM 6 (41,21 $\pm$ 6,43 mg/100g). Esta alteração é facilmente observada visualmente uma vez que os frutos vão passando da cor verde para o vermelho, sendo o vermelho a cor característica das antocianinas. Dentro das antocianinas, a cianidina foi identificada como o principal contribuinte para a cor vermelha característica do fruto (Proloiac & Raynaud, 1981).

Através da análise por HPLC DAD, foi possível a obtenção dos espectros de antocianinas nos frutos com os seis índices de maturação (Fig. 18). A identificação das antocianinas foi feita por comparação com o padrão puro (cianidina-3-galactosido), a que corresponde o pico 2 do cromatograma. As restantes antocianinas foram identificadas por ajuste como padrão e pela igualdade de espectro com os apresentados por Pallauf *et al.*, (2008).



**Fig. 18.** Cromatogramas de extrato do fruto de *Arbutus unedo* L. para os diferentes índices de maturação avaliados. Pico 1, delfinina-3-galactosídeo; pico 2, cianidina-3-galactosídeo; pico 3, cianidina-3-glucosídeo; pico 4, cianidina-3-arabinose; pico 5, delfinina. Os números de 1-6 representam os seis IM.

Na tabela 10 apresentam-se os resultados da evolução das diferentes antocianinas ao longo da maturação. Consta-se que a maturação influencia de forma significativa a composição e a quantidade de antocianinas presentes. Todas as antocianinas identificadas aumentaram o seu teor gradualmente do IM 1 para o IM 6. A cianidina-3-galactosídeo foi a antocianina maioritária em todos os IM, seguida da delfinina. Por sua vez, a antocianina minoritária foi a cianidina-3-glucosídeo, que surgiu apenas a partir do IM 4. Desta forma, a cianidina-3-glucosídeo pode ser considerada um bom indicador do estado de maturação do fruto, uma vez que aparece quando estes passam de laranja forte (IM 4) para o vermelho. Os teores de cianidina-3-galactosídeo variaram entre  $0,54 \pm 0,23$  (IM 1) e  $28,78 \pm 4,19$  mg/100g (IM 6), e a antocianina minoritária, a cianidina-3-glucosídeo, variou entre  $0,34 \pm 0,21$  (IM 4) e  $0,90 \pm 0,06$  mg/100g (IM 5 e 6).

**Tabela 10.** Composição em antocianinas (mg /100g) em frutos de *Arbutus unedo* L. (média ± desvio padrão) com diferentes índices de maturação.

	Índice de maturação (IM)						p	R <sup>2</sup>
	1	2	3	4	5	6		
<b>Delfinina-3-galactosídeo</b>	0,04±0,01 <sup>a</sup>	0,11±0,01 <sup>b</sup>	0,47±0,16 <sup>a,b</sup>	0,92±0,38 <sup>a,b</sup>	6,01±0,71 <sup>c</sup>	4,82±1,71 <sup>a-c</sup>	***	0,676
<b>Cianinina-3-galactosídeo</b>	0,54±0,23 <sup>a</sup>	0,69±0,10 <sup>a</sup>	2,77±0,66 <sup>a</sup>	6,18±1,45 <sup>a</sup>	27,97±3,23 <sup>b</sup>	28,78±4,19 <sup>b</sup>	***	0,787
<b>Cianinina-3-glucosídeo</b>	n.d.	n.d.	n.d.	0,34±0,21 <sup>a</sup>	0,93±0,05 <sup>b</sup>	0,91±0,06 <sup>b</sup>	***	0,803
<b>Cianidina-3-arabinose</b>	n.d.	n.d.	0,12±0,02 <sup>a</sup>	0,22±0,11 <sup>a</sup>	1,21±0,10 <sup>b</sup>	1,04±0,04 <sup>b</sup>	***	0,757
<b>Delfinina</b>	0,06±0,03 <sup>a</sup>	0,14±0,01 <sup>a</sup>	0,41±0,09 <sup>a</sup>	1,34±0,50 <sup>a</sup>	5,50±0,42 <sup>b</sup>	5,67±0,54 <sup>b</sup>	***	0,802
<b>Antocianinas</b>	0,63±0,20 <sup>a</sup>	0,94±0,12 <sup>a</sup>	3,77±0,91 <sup>a</sup>	9,01±2,57 <sup>a</sup>	41,62±2,79 <sup>b</sup>	41,21±6,43 <sup>b</sup>	***	0,782

<sup>a-c</sup> - em cada linha valores médios com diferentes letras diferem significativamente ( $p < 0,05$ ); n.d.- não detetado. n.s  $p > 0,05$  – correlação não significativa; \*  $p \leq 0,05$  – correlação significativa; \*\*  $p \leq 0,01$  – correlação muito significativa; \*\*\*  $p \leq 0,001$  correlação extremamente significativa

Estando as antocianinas relacionadas com o aparecimento dos pigmentos de cor vermelha, podemos afirmar que os resultados obtidos são concordantes com os estudos de cor realizados.

### 3.3.7. Atividade antioxidante

Na Tabela 11 são apresentados os rendimentos de extração para os seis índices de maturação em estudo, bem como os valores de EC<sub>50</sub> do DPPH e do poder redutor, avaliando-se desta forma a atividade antioxidante dos frutos do medronheiro.

Os resultados obtidos para o rendimento de extração variaram com a maturação do fruto tendo sido obtido o menor valor no IM 1 (25,25±1,71 %; p/p) e o maior valor no IM 6 (50,71±2,27 % p/p). Este resultado poderá estar relacionado com a diferente composição que estes frutos apresentam ao longo da maturação e a afinidade dos compostos para com o solvente de extração.

À medida que a maturação aumenta (IM 1- IM 6), os valores de EC<sub>50</sub> quer para o DPPH quer para o poder redutor também aumentaram, diminuindo a atividade antioxidante ao longo da maturação, uma vez que quanto menor o valor de EC<sub>50</sub> maior a capacidade do fruto inibir os radicais livres de DPPH bem como os iões ferrosos.

Esta tendência poderá ser explicada pela grande capacidade redutora total (113,37±5,78 mg de GAE/g de extrato), presente no primeiro índice de maturação e a diminuição destes ao longo da maturação, uma vez que têm um grande potencial antioxidante reportado por outros autores (Malheiro *et al.*, 2012, Oliveira *et al.*, 2011a), apresentando, de forma geral, valores constantes entre maturações.

**Tabela 11.** Rendimento de extração, EC<sub>50</sub> de DPPH e Poder redutor (mg de extrato/ml) ao longo da maturação do fruto de *Arbutus unedo*. (média ± desvio padrão).

	Índice de maturação (IM)						p	R <sup>2</sup>
	1	2	3	4	5	6		
<b>Rendimento de extração (%; p/p)</b>	25,25±1,71 <sup>a</sup>	28,97±1,41 <sup>a</sup>	25,84±1,29 <sup>a</sup>	34,06±2,25 <sup>a</sup>	37,13±1,17 <sup>b</sup>	50,71±2,27 <sup>b</sup>	***	0,780
<b>Capacidade redutora total (mg GAE/g extrato)</b>	113,37±5,78 <sup>b</sup>	76,63±3,89 <sup>a</sup>	83,10±2,06 <sup>a</sup>	85,42±3,92 <sup>a</sup>	82,86±0,56 <sup>a</sup>	82,79±0,62 <sup>a</sup>	***	0,535
<b>EC<sub>50</sub> DPPH</b>	0,18±0,02 <sup>a</sup>	0,29±0,01 <sup>b</sup>	0,39±0,03 <sup>d</sup>	0,32±0,03 <sup>bc</sup>	0,32±0,01 <sup>c</sup>	0,43±0,04 <sup>d</sup>	n.s.	0,608
<b>EC<sub>50</sub> Poder redutor</b>	0,47±0,04 <sup>a</sup>	0,76±0,05 <sup>b</sup>	0,98±0,02 <sup>c</sup>	0,94±0,07 <sup>c</sup>	1,14±0,01 <sup>d</sup>	1,46±0,07 <sup>e</sup>	**	0,931

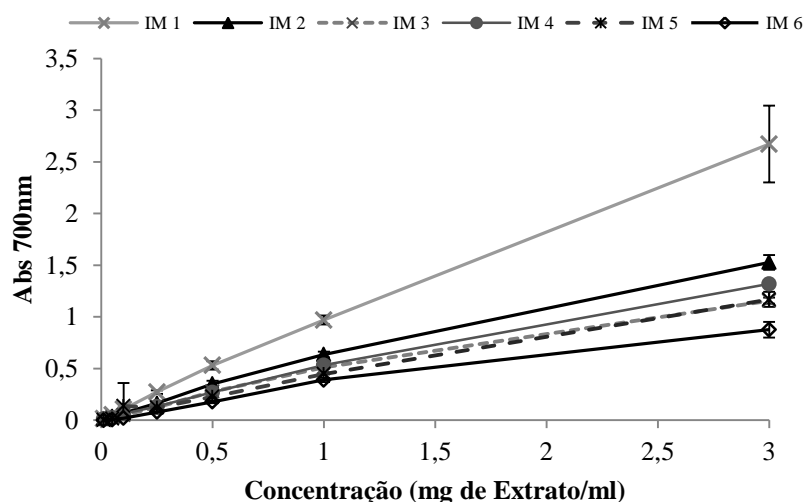
<sup>a-e</sup> - em cada linha valores médios com diferentes letras diferem significativamente ( $p < 0,05$ ); n.s  $p > 0,05$  – correlação não significativa; \*  $p \leq 0,05$  – correlação significativa; \*\*  $p \leq 0,01$  – correlação muito, significativa; \*\*\*  $p \leq 0,001$  correlação extremamente significativa.

Os ensaios do poder redutor permitem avaliar a atividade antioxidante dos extratos pela capacidade de redução do complexo de ferrocianeto Fe<sup>3+</sup> à sua forma ferrosa Fe<sup>2+</sup>. Esta redução pode ser observada pela mudança de cor, de amarelo a azul esverdeado. A transição de cor depende da composição do extrato em antioxidantes redutores, bem como da sua concentração. A monitorização a 700nm do complexo Prússia Perl azul permite determinar a concentração de Fe<sup>2+</sup>. Pelo que o aumento da absorvância representa um aumento na redução de energia.

A capacidade redutora dos extratos é um indicador do seu potencial antioxidante. Desta forma, quanto maior a capacidade antioxidante dos extratos, maior será a capacidade de redução, estabilizando e terminando reações em cadeia.

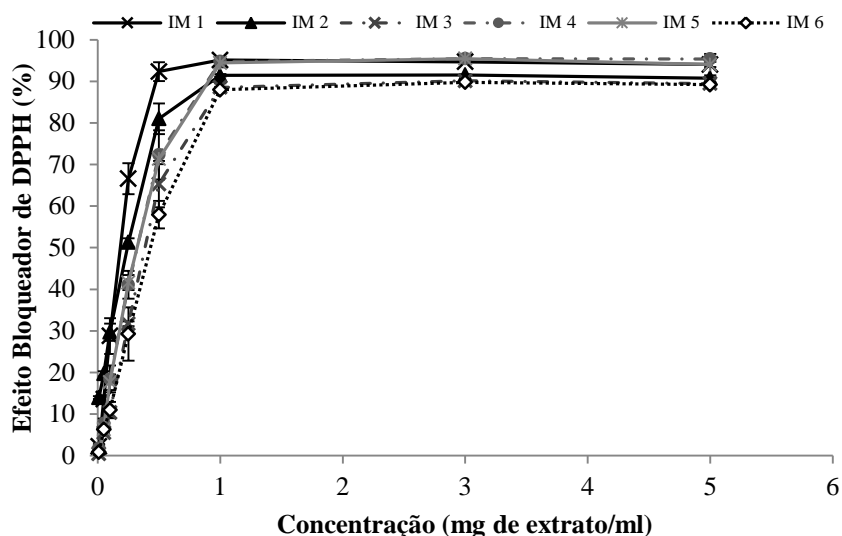
Na Fig. 19 pode-se constatar que à medida que aumenta a concentração de extracto aumenta também a absorvância aumentando também o poder redutor de cada índice de maturação.

Este resultado vem confirmar que o IM 1 é o índice com maior capacidade antioxidante e, portanto, com maior poder de redução. Foi ainda possível observar que com o avançar da maturação a capacidade redutora diminuiu.



**Fig. 19.** Valores de poder redutor, média  $\pm$  desvio padrão, para os extratos de seis índices de maturação, de frutos de *Arbutus unedo* L. IM-Índice de Maturação.

No que respeita à capacidade de inibição dos radicais de DPPH, quanto menor a absorvância, maior será a capacidade antioxidante dos extratos. O método do DPPH é amplamente utilizado para a avaliação da capacidade antioxidante de extratos, manifestando-se pela sua capacidade de bloqueio de radicais livres. Em solução, o DPPH apresenta cor púrpura que é diminuída a amarelo com a doação de elétrons por parte do extrato e conseqüentemente o bloqueio dos radicais.

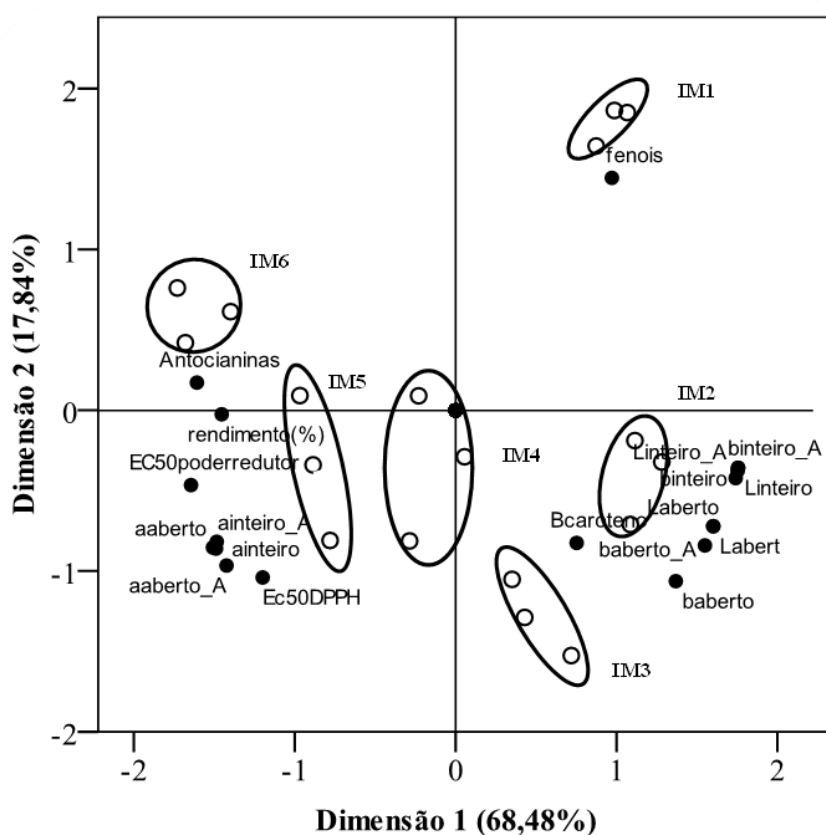


**Fig. 20.** Efeito bloqueador de radicais de DPPH (%), média  $\pm$  desvio padrão, para os extratos de seis índices de maturação de frutos de *Arbutus unedo* L.. IM-Índice de Maturação.

Os diferentes extratos de frutos em estudo apresentam forte atividade antioxidante, observando-se que entre as concentrações de 0,25 e 0,50 (mg de extrato/mL) todos os índices de maturação apresentam inibições dos radicais na ordem dos 50%. Mais uma vez, o IM 1 foi o que apresentou uma maior inibição de radicais, no entanto, todos os seis índices apresentam valores próximos entre si.

A ACP (Fig. 21) aplicada aos resultados obtidos para a atividade antioxidante dos diferentes índices de maturação dos frutos, separou perfeitamente seis grupos distintos que correspondem aos índices de maturação considerados. No eixo positivo da primeira dimensão são apresentados os índices de maturação 1, 2 e 3, expondo os maiores valores de capacidade redutora total (fenóis), carotenóides e maior luminosidade.

Os índices de maturação 4, 5 e 6 podem ser observados na zona negativa do eixo da primeira dimensão. São os índices que apresentam maior rendimento de extração, antocianinas e são caracterizados pela cor vermelha. Demonstram ainda menor atividade antioxidante, podendo estar relacionada com a menor composição em compostos fenólicos, uma vez que surgem em lados opostos da ACP.



**Fig. 21** Análise das componentes principais (ACP), utilizando, cor,  $\beta$ -caroteno, antocianinas, capacidade redutora total,  $EC_{50}$  de DPPH e poder redutor) dos seis índices de maturação de *Arbutus unedo* em estudo. Os factores da ACP explicam 86,32% da variância total.

### 3.4 Conclusão

Neste trabalho procedeu-se à caracterização da composição química nutricional básica e à análise das propriedades antioxidantes dos frutos do medronheiro e a forma como a maturação as influencia.

Os resultados obtidos indicam que o medronho é constituído essencialmente por água (entre 59 e 47%), proteínas (entre 3,5 e 1,4%) e ácidos gordos (entre 0,65 e 0,46%), em especial de  $\alpha$ -linolénico e ácido linoleico. Do ponto de vista de qualidade nutricional pode-se afirmar que a ingestão de medronhos poderá ter interesse, derivado sobretudo da sua riqueza em ácidos gordos ómega 3, que representam cerca de 40-50% da gordura total. O teor destes compostos analisados mostraram ainda variar de acordo com o estado de maturação do medronho. De uma maneira geral, os teores em ácidos gordos e proteínas foram significativamente superiores ( $p \leq 0,001$ ) no IM 1, enquanto que os teores de hidratos de carbono foram superiores no IM 6.

A determinação da composição nutracêutica dos medronhos demonstrou ainda que possuem na sua composição compostos com propriedades antioxidantes, como sejam fenóis, vitamina E (em especial  $\alpha$ -tocoferol), antocianinas (em especial cianidina-3-galactosídeo) e  $\beta$ -caroteno. Estes resultados evidenciam o interesse deste fruto não só a nível nutricional como medicinal. A composição e o teor de alguns destes compostos antioxidantes analisados mostraram ainda variações ao longo do processo de maturação do fruto. Neste âmbito, verificou-se que algumas antocianinas (cianinina-3-glucosídeo) e o  $\beta$ -caroteno, poderão constituir indicadores do estado de maturação do fruto.

A riqueza dos medronhos em compostos antioxidantes permitiu explicar a forte atividade antioxidante exibida pelos extratos dos frutos nos diferentes estados de maturação. Constatou-se ainda que os frutos com IM 1 foram os que apresentaram uma maior capacidade antioxidante. Os efeitos sinérgicos dos diferentes compostos antioxidantes encontrados nos medronhos (nomeadamente fenóis, vitaminas e  $\beta$ -caroteno) contribuem assim para explicar os seus usos tradicionais como antissépticos e no tratamento de diversas doenças (gastrointestinais, dermatológicos, urológicos, cardiovasculares, renais).

Os resultados obtidos apresentam importância dado que permitiram ampliar o conhecimento e, conseqüentemente, o uso tradicional do medronho quer a nível

farmacêutico como medicinal, como na alimentação ou como aditivo natural. Com base nos resultados obtidos, podemos afirmar que o aumento do consumo dos frutos de *A. unedo* pode prevenir o aparecimento de doenças devido à sua composição em antioxidantes, em especial se consumidos nos primeiros estados de maturação.





## CAPÍTULO 4

## CONCLUSÕES GERAIS



## 4.1 Conclusões Gerais

Com o presente trabalho, demonstrou-se que todas as partes do medronheiro estudadas apresentam excelente capacidade antioxidante a baixas concentrações. As cascas, folhas, flores e frutos demonstraram apresentar na sua composição uma quantidade considerável de fenóis totais, e uma notável capacidade para bloquear radicais livres. Este aspeto foi sobretudo evidenciado pelas cascas do tronco e, em menor extensão pelas flores e folhas, seguido pelos frutos. Os medronhos, apesar de terem exibido uma menor capacidade antioxidante comparativamente aos outros órgãos analisados, apresentaram também características de interesse. Demonstraram ser nutricionalmente saudáveis, uma vez que são ricos em ácidos gordos ómega-3 (ácido  $\alpha$ -linolénico) e pobres em gorduras saturadas (SFA), e simultaneamente apresentaram quantidades interessantes de compostos antioxidantes como fenóis, vitamina E, antocianinas e  $\beta$ -caroteno. Adicionalmente, verificou-se ser um alimento rico em água, e uma boa fonte de hidratos de carbono e de proteínas. A composição e o teor destes compostos nos frutos variou de acordo com o seu estado de maturação. De uma maneira geral, os frutos maduros (IM 6) apresentaram menor teor em ácidos gordos e compostos antioxidantes (fenóis, vitamina E e  $\beta$ -caroteno), e maior teor em hidratos de carbono, face aos frutos com IM 1. Estas diferenças de composição em compostos antioxidantes traduziram-se na capacidade antioxidante exibida pelos frutos nos diferentes estados de maturação. Os frutos com IM 1 foram os que apresentaram uma maior capacidade antioxidante. Com base nestas diferenças de composição foi ainda possível identificar o IM 3 como sendo o ponto de viragem a partir do qual o fruto está pronto a ser consumido.

Este trabalho permitiu uma caracterização das cascas, folhas, flores e frutos do medronheiro, quer ao nível do potencial antioxidante, bem como da composição química. A avaliação da atividade antioxidante das cascas e das flores são trabalhos inovadores, tendo sido efetuados pela primeira vez. De igual modo, o efeito da maturação do fruto na sua composição química e propriedades antioxidantes tem sido pouco estudado. Pelas propriedades demonstradas, as cascas, folhas, flores e frutos de *A. unedo*, apresentam um grande potencial para serem utilizados na indústria farmacêutica, cosmética e alimentar. No que concerne aos frutos, os resultados obtidos apontam para a sua introdução na alimentação humana, quer *in natura* quer como

antioxidantes na indústria, dando desta forma utilidade aos frutos verdes, uma vez que demonstraram a maior capacidade antioxidante.

Apesar do estudo ter revelado fortes capacidades e potencialidades desta espécie, é necessário aperfeiçoar alguns pontos, nomeadamente:

- ❖ Caracterização físico-química das cascas e flores;
- ❖ Desenvolvimento de novos produtos de forma a incorporar os frutos em novos géneros alimentícios, valorizando-os pelas propriedades antioxidantes e nutricionais;
- ❖ Desenvolvimento de produtos naturais, como suplementos alimentares, e cosméticos





## 5. Referências Bibliográficas

- Afkir, S., Nguелеfack, T. B., Aziz, M., Zoheir, J., Cuisinaud, G., Bnouham, M., Mekhfi, H., Legssyer, A., Lahlou, S., Ziyat, A. (2008). *Arbutus unedo* prevents cardiovascular and morphological alterations in L-NAME-induced hypertensive rats. Part I: Cardiovascular and renal hemodynamic effects of *Arbutus unedo* in L-NAME induced hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **116**: 288-295.
- Alarcão-E-Silva, M., Leitão, A.E.B., Azinheira, H.G., Leitão, M.C.A. (2001). The *Arbutus* berry: studies on its color and chemical characteristics at two mature stages. *Journal Food Composition and Analysis*, **14**: 27–35.
- Amaro, L. F., Soares, M. T., Pinho, C., Almeida, I. F., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O. (2012). Influence of Cultivar and Storage Conditions in Anthocyanin Content and Radical-Scavenging Activity of Strawberry Jams. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, **69**: 118-122.
- AOAC (1995). Official Methods of Analysis, 16<sup>th</sup> ed.; Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA.
- AOAC (2000). Official Methods of Analysis of AOAC International, 17<sup>th</sup> ed.; Horwitz, W., Ed.; AOAC: Arlington, VA, Vol. II (1-3).
- Aruoma, O. (1996). Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **73**: 1617-1625.
- Ayaz, F.A., Kucukislamoglu, M., Reunanen, M. (2000). Sugar, Non-volatile and Phenolic Acids Composition of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L. var. *ellipsoidea*) Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **13**: 171-177.
- Barros, L., Carvalho, A., Morais, J., Ferreira, I. (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterization in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*, **120**: 247-254.
- Berker, K., Güçlü, K., Tor, I., Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, **72**: 1157-1165.
- Bianchi, M. L. P., Antunes, L. M. G. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição Campinas*, **12**: 123-130.

- Carcache-Blanco, E., Cuendet, M., Park, E.J., Su, B.N., Rivero-Cruz, J.F., Farnsworth, N.R., Pezzuto, J.M., Douglas Kinghorn, A. (2006). Potential cancer chemopreventive agents from *Arbutus unedo*. *Natural Product Research*, **20**: 327–334.
- Carr A.C., McCall M.R., Frei, B. (2000). Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **20**: 1716-1723.
- Carrapiço, F. (2001). A estratégia evolutiva de ocupação do meio aéreo e o aparecimento de novas vias bioquímicas. Departamento de Biologia Vegetal, Secção de Biologia Celular e Biotecnologia Vegetal. Acedido em: 10, 09, 2012: [http://azolla.fc.ul.pt/aulas/BiologiaCelular/docs/Lenhinas\\_e\\_Polifenóis](http://azolla.fc.ul.pt/aulas/BiologiaCelular/docs/Lenhinas_e_Polifenóis).
- Celikel, G., Demirsoy, L., Demirsoy, H. (2008). The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) selection in Turkey. *Scientia Horticulturae*, **118**: 115-119.
- Cerutti, P., Ghosh, R., Oya, Y., Amstad, P. (1994). The role of cellular antioxidant defense in oxidant carcinogenesis. *Environmental health perspectives*, **102**: 129-129.
- Cornara, L., La Rocca, A., Marsili, S., Mariotti, M. (2009). Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, **125**: 16-30.
- El Haouari, M., Lopez, J.J., Mekhfi, H., Rosado, J.A., Salido, G.M., (2007). Antiagregant effects of *Arbutus unedo* extracts in human platelets. *Journal of Ethnopharmacology*, **113**: 325-331.
- El-Hilaly, J., Hmammouchi, M., Lyoussi, B. (2003). Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). *Journal of Ethnopharmacology*, **86**: 149-158.
- Ferreira, I., Abreu, R. (2007). Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise IV*: 32-39.
- Finkel, T., Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **408**: 239-247.
- Finley, J.W., Kong A.N., Hintze, K.J., Jeffery, E.H., Ji, L.L., Lei, X.G. (2011). Antioxidants in foods: state of the science important to the food industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**: 6837–6846.
- Fiorentino, A., Castaldi, S., D'Abrosca, B., Natale, A., Carfora, A., Messere, A., Monaco, P. (2007). Polyphenols from the hydroalcoholic extract of *Arbutus unedo*

living in a monospecific Mediterranean woodland. *Biochemical Systematics and Ecology*, **35**: 809-811.

- Firmino, A., Abreu, H.S., Portugal, A.N.P., Nascimento, A. M., Souza, E. L., Pereira, R. P. W., Monteiro, M. B.O., Maêda, J. M. (2006). Alterações ligno-anatômicas em *Solanum gilo* Raddi por aplicação de cálcio e boro como estratégia de defesa. *Ciência e Agrotecnologia*, **30**: 394-401.
- Fortalezas, S., Tavares, L., Pimpão, R., Tyagi, M., Pontes, V., Alves, P., McDougall, G., Stewart, D., Ferreira, R., Santos, C. (2010). Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit (*Arbutus unedo*). *Nutrients*, **2**: 14-229.
- Fridovich, I. (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Annals of the New York Academy of Sciences*, **893**: 13-18.
- Gaspar, E., Neves, H., Noronha, J. (1987). Application of HPLC-PBMS to the identification of unknown components in a triterpenoid fraction of *Arbutus unedo* fruits. *Journal of High Resolution Chromatography*, **20**: 417-420.
- Gilbert, D.L. (2000). Fifty years of radical ideas. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **899**: 1-14.
- Gomes, F., Canhoto, J. (2009). Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, **45**: 72-82.
- Goodwin, T.W., Mercer, E.I. (1983). Introduction to plant biochemistry, second edition, *Pergamon Press*, Oxford and New York. ISBN 10: 0080249213, 78-83.
- Gopinathan, V., Miller, N.J., Milner, A.D., Rice-Evans, C.A (1994). Bilirubin and ascorbate antioxidant activity in neonatal plasma. *FEBS Letters*, 197-200.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, **18**: 125-126.
- Heinrich, M. (2005). Understanding local Mediterranean diets: A multidisciplinary pharmacological and ethnobotanical approach. *Pharmacological Research*, **52**: 353-366.
- Helbig, D., Böhm, V., Wagner, A., Schubert, R., Jahreis, G. (2008). Berry seed press residues and their valuable ingredients with special regard to black currant seed press residues. *Food Chemistry*, **111**: 1043-1049.

- Isbilir, S., Orak H., Yagar, H., Ekinci, N. (2012). Determination of antioxidante activities strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) flowers and fruits at diferent ripening stages. *Acta Scientiarum Polonorum: Hortorum Cultus*, **11**: 223-237.
- Jakobe L., Seruga M., Novak I., Medvidovic-Kosanovic M. (2007). Flavonols, phenolic acids and antioxidant activity of some red fruits. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **103**: 369-378.
- Kivçak, B., Mert, T. (2001). Quantitative determination of  $\alpha$ -tocopherol in *Arbutus unedo* by TLC-densitometry and colorimetry. *Fitoterapia*, **72**: 656-661.
- Konstantinidis, P., Tsiourlis, G., Xofis, P. (2006). Effect of fire, aspect and pré-fire plant size on the growth of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree) resprouts. *Forest Ecology and Management*, **225**: 359-367.
- Legssyer, A., Ziyat, A., Mekhfi, H., Bnouham, M., Herrenknecht, C., Roumy, V., Fourneau, C., Laurens, A., Hoerter, J., Fischmeister, R. (2004). Tannins and catechin gallate mediate the vasorelaxant effect of *Arbutus unedo* on the rat isolated aorta. *Phytotherapy Research*, **18**: 889-894.
- Leonti, M., Casu, L., Sanna, F., Bonsignore, L. (2009). A comparison of medicinal plant use in Sardinia and Sicily—De Materia Medica revisited? *Journal of Ethnopharmacology*, **121**: 255-267.
- Liu, F., Ng, T.B. (2000). Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. *Life Sciences*, **66**: 725-735.
- MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86**: 2046–2056
- Machlin, L.J., Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB Journal*, **1**: 441-445.
- Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Lima, J.L.F.C. (2008) Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, **613**: 1-19.
- Males, Z., Plazibat, M., Vundac, V.B., Zunta, I. (2006). Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree – *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Acta Pharmaceutica*, **56**: 245-250.

- Malheiro, R., Sá, O., Pereira, E., Aguiar, C., Baptista, P., Pereira, J.A. (2012). *Arbutus unedo* L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. *Industrial Crops and Products*, **37**: 473-478.
- Mariotto, S., Esposito, E., Di Paola, R., Ciampa, A., Mazzon, E., Carcereri de Prati, A., Darra, E., Vincenzo, S., Cucinotta, G., Caminiti, R., Suzuki, H., Cuzzocrea, S. (2008). Protective effect of *Arbutus unedo* aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice. *Pharmacological Research*, **57**: 110-124.
- Mekhfi, H., El Haouari, M., Bnouham, M., Aziz, M., Ziyat, A., Legssyer, A. (2006). Effects of extracts and tannins from *Arbutus unedo* leaves on rat platelet aggregation. *Phytotherapy Research*, **20**: 135-139.
- Miller, D.M., Buettner, G.R., Aust, S.D. (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radical Biology & Medicine*, **8**: 95-108.
- Moreno, Jiménez, E., Peñalosa, J., Carpena, Ruiz, R., Esteban, E. (2008). Comparison of arsenic resistance in Mediterranean woody shrubs used in restoration activities. *Chemosphere*, **71**: 466-473.
- Nagata, M., Yamashita, I. (1992). Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish*, **39**: 925-928.
- Novais, M., Santos, I., Mendesa, S., Pinto-Gomes, C. (2004). Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, **93**: 183-195.
- Oliveira, I., Baptista, P., Malheiro, R., Casal, S., Bento, A., Pereira, J.A. (2011a). Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. *Food Research International*, **44**: 1401-1407.
- Oliveira, I., Batista, P., Bento, A., Pereira, JA. (2011b). *Arbutus unedo* L. and its benefits on human health. *Journal of Food and Nutrition Research*, **50**: 73-85.
- Oliveira, I., Coelho, V., Baltasar, R., Pereira, J., Baptista, P. (2009). Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. *Food and Chemical Toxicology*, **47**: 1507-1511.
- Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L., Pereira, J. A. (2008). Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food and Chemical Toxicology*, **46**: 2326-2331.

- Oliveira, I., Valentão, P., Lopes, R., Andrade, P.B., Bento, A., Pereira, J.A. (2009). Phytochemical characterization and radical scavenging activity of *Portulaca oleracea* L. leaves and stems. *Microchemical Journal*, **92**: 129-134.
- Orak, H.H., Aktas, T., Yagar, H., Isbilir, S., Ekinçi, N., Sahin, F.H. (2011). Antioxidant activity, some nutritional and color properties of vacuum dried strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit. *Acta Scientiarum Polonorum: Technologia. Alimentaria*, **10**: 327-338.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, **44**: 307-315.
- Özcan, M.M., Haciseferogulları, H. (2007). The Strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: Chemical composition, physical properties and mineral contents. *Journal of Food Engineering*, **78**: 1022-1028.
- Ozgen, M., Torun, A.A., Ercisli, S., Serce, S. (2009). Changes in chemical composition, antioxidant activities and total phenolic content of *Arbutus andrachne* fruit at different maturation stages. *Italian Journal of Food Science*, **21**: 65-72.
- Pallauf, K., Rivas-Gonzalo, J.C., del Castillo, M.D., Cano, M.P., Pascual-Teresa, S. (2008). Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, **21**: 273-281.
- Pawlowska, A. M., De Leo, M., Braca, A. (2006). Phenolics of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) fruits: Identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**: 10234-10238.
- Pedro, J. (1994). Carta da distribuição de figueira e medronheiro – Notícia Explicativa II.6. Ministério do Ambiente e Recursos Naturais, Direção Geral do Ambiente, Lisboa, Portugal: 10-11.
- Percival, M. (1998). Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*, **31**: 1-4.
- Piotto, B., Piccini, C., Arcadu, P. (2001). Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea. *Manuale ANPA* (Agenzia Nazionale per la Protezione dell' Ambiente Dipartimento Prevenzione e Risanamento Ambientali), 32-38.
- Podda, M., Weber, C., Traber, M.G., Packer, L. (1996). Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinol, and ubiquinone *Journal of Lipid Research*, **37**: 893.

- Proloiac, A., Raynaud, J. (1981). Les pigments anthocyaniques des fruits d'*Arbutus unedo* L. (Ericacees). *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, **15**: 109-112.
- Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**: 3396-3402.
- Ridnour, L.A., Thomas, D.D., Mancardi, D., Espey, M.G., Miranda, K.M., Paolocci, N., Feelisch, M., Fukuto, J., Wink, D.A. (2004). The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *The Journal of Biological Chemistry*, **385**: 1-10.
- Rocha-Afonso, M. L. (1991). Plantas do Algarve. Serviço Nacional de Parques, Recursos e Conservação da Natureza, Lisboa.
- Ruiz-Rodríguez, B.M., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M.C., Cámara, M., Díez-Marqués, C., Pardo-de-Santayana, M., Molina, M., Tardío, J. (2011). Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data. *Food Research International*, **44**: 1244-1253.
- Sanjust, E., Mocci, G., Zucca, P., Rescigno, A. (2008). Mediterranean shrubs as potential antioxidant sources. *Natural Product Research*, **22**: 689-708.
- Sies, H. (1993). Strategies of antioxidante defence. *European Journal Biochemistry*, **215**: 213-213.
- Simonetti, M., Damiani, F., Gabrielli, L., Cossignani, L., Blasi, F., Marini, F., Montesano, D., Maurizi, A., Ventura, F., Bosi, A., Damiani, P. (2008). Characterization of triacylglycerols in *Arbutus unedo* L. seeds. *Italian Journal of Food Science*, **20**: 49-56.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. Jr. (1965). Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**:144-158.
- Soares, A., Machado, O. (2007). Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigénio. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, **1**: 9.
- Wang, S., Lin, H. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**: 140-146.

- Wang, S.Y. (2011). Correlation of antioxidants and antioxidant enzymes to oxygen radical scavenging activities in berries. *Berries and cancer prevention*, **2**: 79-97.
- Ziyyat, A., Boussairi, E. (1998). Cardiovascular effects of *Arbutus unedo* L. in spontaneously hypertensive rats. *Phytotherapy Research*, **12**: 110-113.
- Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfil, A., Dassouli, A., Serhrouchni, M., Benjelloun, W. (1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal. Ethnopharmacol*, **58**: 45-54.