



Extratos fenólicos de *Rubus ulmifolius* Schott: caracterização química, atividade antioxidante e encapsulação para fins nutracêuticos

Ana Cláudia Fernandes Martins

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e
à Faculdade de Farmácia da Universidade de Salamanca para
obtenção do Grau de Mestre em Farmácia e Química de
Produtos Naturais*

Orientado por
Isabel Cristina F.R. Ferreira
Maria Filomena Barreiro
Ana Maria Pinto Carvalho

Bragança
2013

AGRADECIMENTOS

Ao longo desta etapa de estudo e trabalho que agora termina participaram, direta ou indiretamente, várias pessoas que merecem o meu sincero agradecimento. De modo particular gostaria de agradecer:

Às Professoras Doutoras Isabel C.F.R. Ferreira, Maria Filomena Barreiro e Ana Maria Carvalho pela excelente orientação, pelo apoio, disponibilidade e simpatia, bem como por toda a experiência e conhecimentos que me transmitiram.

À Doutora Lillian Barros por todo o apoio, disponibilidade e simpatia que sempre disponibilizou.

À Doutora Isabel Fernandes por toda a orientação no laboratório para a execução da parte experimental, bem como todo o apoio moral que me incutiu durante o desenvolvimento deste trabalho, à sua disponibilidade, conhecimentos científicos e amizade.

Ao Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada, em particular ao BioChemCore, e a todos aqueles que lá trabalham pela constante boa disposição.

Ao Laboratório de Processos de Separação e Reação – Pólo do IPB (LSRE-IPB), e a todos aqueles que lá trabalham pela boa disposição.

À minha família por todo o amor, pela força, apoio e incentivo que sempre demonstrou, em especial ao longo desta etapa pois, com o seu empenho, tudo ficou mais fácil.

E, por fim, a todos aqueles que, de uma forma mais ou menos direta, me apoiaram ao longo desta caminhada.

Obrigada!

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABELAS	v
ABREVIATURAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Atividade antioxidante	1
<i>1.1.1. Radicais livres e stresse oxidativo</i>	1
<i>1.1.2. Antioxidantes e fitoquímicos</i>	3
1.2. As plantas medicinais	5
1.3. Caracterização botânica da planta em estudo, <i>Rubus ulmifolius</i> Schott	8
1.4. Constituintes bioativos das plantas	9
1.5. Alimentos funcionais e nutracêuticos	10
1.6. Microencapsulação	12
<i>1.6.1. Agente encapsulante</i>	13
<i>1.6.2. Métodos de microencapsulação</i>	14
<i>1.6.3. Técnica de atomização/coagulação</i>	16
1.7. Objetivos	18
II. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1. Material vegetal	19
2.2. Solventes, reagentes e padrões	19
2.3. Procedimentos de extração de compostos fenólicos	20
<i>2.3.1. Decocção</i>	20
<i>2.3.2. Maceração numa mistura hidroalcoólica</i>	20
2.4. Caracterização da composição dos extratos em compostos fenólicos	20

2.5. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	22
2.5.1. Atividade captadora de radicais DPPH	22
2.5.2. Poder redutor	22
2.5.3. Inibição da descoloração do β -caroteno	23
2.5.4. Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)	23
2.6. Microencapsulação do extrato hidroalcoólico de <i>R. ulmifolius</i>	24
2.7. Caracterização das microesferas	25
2.8. Incorporação do extrato hidroalcoólico de <i>R. ulmifolius</i>, livre e em microesferas, no iogurte	26
2.9. Análise estatística	27
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.1. Perfil fenólico do extrato hidroalcoólico e da decocção	28
3.2. Propriedades antioxidantes <i>in vitro</i>	34
3.3. Produção de microesferas de alginato contendo extrato hidroalcoólico de <i>R. ulmifolius</i>	35
3.4. Reidratação das microesferas após a liofilização	36
3.5. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)	37
3.6. Incorporação do extrato hidroalcoólico de <i>R. ulmifolius</i>, livre e em microesferas, no iogurte	39
IV. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS DE TRABALHO FUTURO	41
V. BIBLIOGRAFIA	43
VI. ANEXOS	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Visão geral das principais reações envolvendo espécies reativas de oxigénio (ROS)/espécies reativas de azoto (RNS), e das principais defesas antioxidantes endógenas, enzimáticas e não-enzimáticas, da célula	2
Figura 2. Principais causas para a super-produção de radicais livres (stresse oxidativo), potenciais alvos celulares e consequências do stresse oxidativo	3
Figura 3. <i>Rubus ulmifolius</i> Schott em floração (A) e detalhe da flor (B) e do fruto (C).....	8
Figura 4. Estrutura das micropartículas	13
Figura 5. Esquematização do sistema NISCO Var J30	16
Figura 6. Perfil fenólico, obtido por HPLC, do extrato hidroalcoólico de <i>Rubus ulmifolius</i> , registado a 370 nm (A) e 280 nm (B) para os flavonoides e ácidos fenólicos, respetivamente	32
Figura 7. A- Observação das microsferas após atomização; B- Observação das microesferas após a coagulação	36
Figura 8. A- Observação das microsferas secas; B- Observação das microesferas hidratadas	37
Figura 9. Espectro do alginato, do extrato hidroalcoólico e das microesferas contendo o extrato hidroalcoólico de <i>R. ulmifolius</i>	38
Figura 10. A- Observação das microsferas incorporadas no iogurte no tempo inicial (t0); B- Observação das microesferas incorporadas no iogurte após três dias (t3).....	40

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Usos medicinais da espécie estudada referidos em inquéritos etnobotânicos realizados recentemente na Península Ibérica	7
Tabela 2. Exemplos de agentes encapsulantes usados na microencapsulação de acordo com a sua origem.....	14
Tabela 3. Métodos utilizados na elaboração das microcápsulas.....	15
Tabela 4. Exemplos de microencapsulação de princípios ativos contendo extratos fenólicos com interesse na área alimentar.....	17
Tabela 5. Tempo de retenção (Rt), comprimentos de onda de absorção máxima na região do visível ($\lambda_{\text{máx}}$), dados do espectro de massa, identificação e quantificação de compostos fenólicos de <i>Rubus ulmifolius</i>	33
Tabela 6. Atividade antioxidante (valores de EC ₅₀) do extrato hidroalcoólico e da decocção de <i>Rubus ulmifolius</i>	35
Tabela 7. Atividade antioxidante do iogurte enriquecido com extrato hidroalcoólico de <i>Rubus ulmifolius</i> livre e microencapsulado	39

ABREVIATURAS

- ABTS-** Ácido 2,2'-azino-*bis*(3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico)
- ACR-** Atividade captadora de radicais
- ANOVA-** Análise de variância
- CAT-** Catalase
- CTE-** Cadeira transportadora de electrões
- $\lambda_{\text{máx}}$ - Comprimento de onda máximo em nm
- BRESA-** Herbário da Escola Superior Agrária de Bragança
- DAD-** Detector de Díodos
- DCV-** Doenças cardiovasculares
- DP-** Desvio padrão
- DPPH-** 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
- DNA-** Ácido desoxirribonucleico
- EC₅₀-** Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio de poder redutor
- EE-** Eficiência de encapsulação
- ESI-** Ionização por spray eletrostático
- EUA-** Estados Unidos da América
- FTIR-** Infravermelho por transformada de Fourier
- GC-** Cromatografia gasosa
- GSH-** Glutathione
- GSH-Px-** Glutathione peroxidase
- GSH-R-** Glutathione reductase
- HPLC-** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- [M-H]⁻** - Ião pseudomolecular
- MDA-** Malondialdeído
- MO-** Microscopia ótica
- MS-** Espectrometria de massa
- m/z-** Relação massa/carga dos fragmentos iónicos formados num espectro de massa
- n.a-** Não aplicável
- nd-** Não detetado
- ROS-** Espécies reativas de oxigénio

RNA- Ácido ribonucleico

RNS- Espécies reativas de azoto

rpm- Rotação por minuto

Rt- Tempo de retenção

SOD- Superóxido dismutase

TBA- Ácido tiobarbitúrico

TBARS- Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico

UV – Radiação ultravioleta

v/v – Relação volume/volume

w/v- Relação massa/volume

WHO- Organização Mundial de Saúde

RESUMO

Rubus ulmifolius Schott (Rosaceae), conhecida como amora silvestre, é um arbusto perene encontrado em *habitats* silvestres e cultivados da Europa, Ásia e África do Norte. Tradicionalmente é conhecido pelas suas propriedades medicinais, incluindo atividade antioxidante. Neste trabalho, caracterizaram-se quimicamente dois extratos fenólicos obtidos a partir de botões florais de *R. ulmifolius*, decocção e extrato hidroalcoólico, tendo sido identificados vários compostos fenólicos, maioritariamente derivados de elagitaninos nomeadamente, os isómeros sanguin H-10 e lambertianina.

Comparativamente à decocção, o extrato hidroalcoólico apresentou um conteúdo em compostos fenólicos superior e uma maior atividade antioxidante. A sua forma liofilizada foi a escolhida para microencapsular pela técnica de atomização seguida de coagulação tendo-se produzido microesferas de alginato que foram posteriormente incorporadas num iogurte natural. Os resultados obtidos mostraram que ambas as formas (extrato livre e microencapsulado) revelaram maior atividade antioxidante que o controlo e que originaram produtos com melhor preservação dessa atividade ao longo do tempo.

Em síntese, os resultados obtidos demonstraram o potencial antioxidante do extrato hidroalcoólico de *R. ulmifolius* e a eficiência da microencapsulação para a sua preservação, abrindo assim possibilidades para a sua exploração em aplicações na indústria alimentar.

ABSTRACT

Rubus ulmifolius Schott (Rosaceae), known as wild blackberry, is a perennial shrub found in wild and cultivated habitats in Europe, Asia and North Africa. Traditionally, it is considered to have different medicinal properties, including antioxidant activity. In the present work, phenolic extracts obtained from *R. ulmifolius* flower buds were chemically characterized and incorporated (directly or microcapsulated) into yogurts in order to achieve antioxidant benefits. Various phenolic compounds were identified in both decoction and hydroalcoholic extract of flowers, being ellagitannin derivatives the most abundant ones, namely sanguin H-10 isomer and lambertianin.

Comparatively to the decoction form, the hydroalcoholic extract presented both higher antioxidant activity and higher phenolic content, being its lyophilized form used to microencapsulate. A spray-coagulation technique was chosen to produce alginate based microspheres which were then successfully incorporated into a natural yogurt.

The achieved results pointed out that the yogurt containing the microencapsulated extract gave rise to slightly higher antioxidant activity, and that both forms (free and microencapsulated extract) gave higher activity than the control. Furthermore, both forms contributed to preserve antioxidant activity along time.

The results obtained demonstrated the antioxidant potential of *R. ulmifolius* hydroalcoholic extract and the effectiveness of the microencapsulation technique, thus opening new perspectives for the exploitation of these natural phenolic extracts in food applications.

I. INTRODUÇÃO

1.1. Atividade antioxidante

1.1.1. Radicais livres e stresse oxidativo

Ao longo do século XX inúmeras doenças e distúrbios, como o cancro, doenças cardiovasculares e inflamatórias, foram estudadas tendo-se encontrado provas irrefutáveis que as relacionam, direta ou indiretamente, com o stresse oxidativo, o que aumentou exponencialmente o interesse pelos produtos naturais, especialmente na área da saúde (Laguerre, 2007; Niki, 2010).

Um radical livre é definido como qualquer átomo, molécula ou ião que possui eletrões desemparelhados na orbital exterior (Carocho & Ferreira, 2013). Os radicais livres derivados do oxigénio incluem as chamadas ROS (espécies reativas de oxigénio) e representam a classe mais importante de espécies reativas geradas pelo organismo (Ferreira & Abreu, 2007).

Efetivamente, nos organismos aeróbios, os radicais livres estão constantemente a ser produzidos durante o funcionamento normal da célula, a maior parte sob a forma de ROS, mas também de espécies reativas de azoto (RNS). A exposição do organismo a radicais livres leva ao desenvolvimento de mecanismos de defesa endógenos de forma a eliminá-los (Ferreira et al., 2009; Goetz et al., 2008; Valko et al., 2007).

Uma vez produzidos, a maior parte dos radicais livres são removidos pelas defesas antioxidantes. A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes são uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo (Ferreira & Abreu, 2007; Valko et al., 2007).

No entanto, há situações em que o equilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes pode ser destruído devido a uma produção excessiva de ROS ou a uma deficiência nas defesas antioxidantes da célula (Ferreira & Abreu, 2007).

Assim, a este desequilíbrio chamamos stresse oxidativo e nestas situações as ROS em excesso podem oxidar e danificar lípidos celulares, proteínas, DNA e RNA, levando à sua modificação e, frequentemente, à inutilização inibindo a sua função normal (Carocho & Ferreira, 2013).

Na **Figura 1** estão apresentadas algumas das principais vias de produção de ROS.

A adição de um eletrão ao oxigénio molecular (O_2) gera o radical anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), considerado a ROS “primário”. Este radical pode originar outros radicais “secundários” através da interação com outras moléculas, tais como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo ($HO\cdot$) (Ferreira et al., 2009).

O $HO\cdot$, formado através da reação de Fenton, tem um tempo de vida muito curto mas é extremamente reativo, sendo mesmo o radical que causa mais danos. Ataca principalmente moléculas de DNA, danificando o esqueleto de desoxirribose, bem como purinas e pirimidinas (Ferreira et al., 2009).

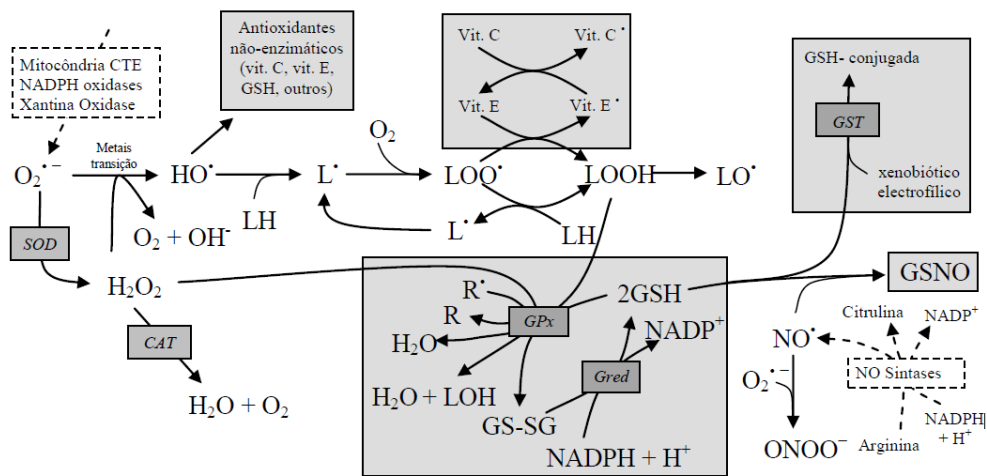


Figura 1. Esquema representativo de algumas das principais reações que envolvem espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de azoto (RNS). Apresentam-se as fontes endógenas de ROS/RNS mais representativas (retângulos tracejados): Cadeia transportadora de eletrões mitocondrial (CTE), NADPH oxidases e xantina oxidase para as ROS e NO sintases para as RNS. Os radicais aniões superóxido ($O_2^{\cdot-}$) produzidos podem ser transformados em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radicais hidroxilo ($HO\cdot$). Estes radicais podem reagir com lípidos membranares (LH), promovendo o processo de peroxidação lipídica originando radicais lipídicos ($L\cdot$), radicais peróxido ($LOO\cdot$) e hidroperóxidos lipídicos ($LOOH$). A sintase do óxido nítrico mitocondrial (NOS) produz óxido nítrico ($NO\cdot$), que combina com o anião superóxido para produzir peroxinitrílo ($ONOO^-$). Quando em excesso, todos estes ROS podem causar danos mitocondriais e celulares (Ferreira & Abreu, 2007).

O stresse oxidativo pode ter causas naturais, como o que ocorre em situações de exercício físico extremo, ou em processos de inflamação; mas pode também ter causas não naturais como a presença de xenobióticos no organismo.

Os radicais livres, quando em excesso, podem danificar todo o tipo de biomoléculas, incluindo ácidos nucleicos, lípidos membranares, proteínas e glúcidos, inibindo a sua função normal (Carocho & Ferreira, 2013). Desta forma, o stresse oxidativo pode estar relacionado com um conjunto variado de fenómenos biológicos e numerosas patologias, incluindo vários tipos de cancro, processos inflamatórios, artrite reumatoide, asma, diabetes, cirrose, doenças cardiovasculares, doenças oculares, aterosclerose, doenças de Parkinson e Alzheimer, desordens do foro neurológico e o processo de envelhecimento (**Figura 2**) (Carocho & Ferreira, 2013).

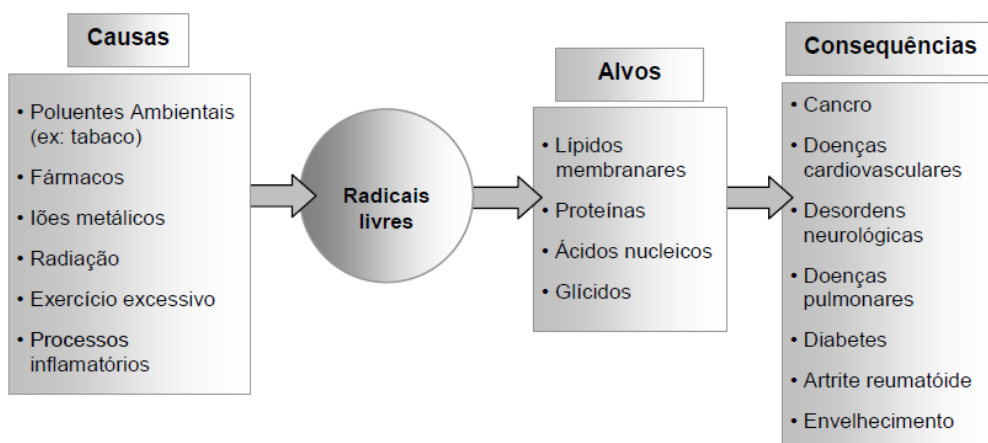


Figura 2. Principais causas para a super-produção de radicais livres (stresse oxidativo), potenciais alvos celulares e consequências do stresse oxidativo (Ferreira et al., 2009).

1.1.2. Antioxidantes e fitoquímicos

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias naturais ou sintéticas adicionadas aos produtos a fim de prevenir ou retardar a sua deterioração pela ação do oxigénio (Huang et al., 2005).

Existem vários tipos de antioxidantes, podendo estes ser classificados quanto ao mecanismo de ação que desempenham na célula. Estes podem ser preventivos, captadores, reparadores ou de adaptação (Niki, 2010).

Os antioxidantes preventivos constituem a primeira linha de defesa do organismo (*e.g.*, SOD, superóxido dismutase e CAT, catalase), suprimindo a formação

de ROS. Os antioxidantes captadores funcionam como segunda linha de defesa, removendo rapidamente espécies reativas, impedindo o ataque a várias biomoléculas (*e.g.*, α -tocoferol, ácido ascórbico e GSH, glutathiona). Por sua vez, os antioxidantes reparadores atuam numa terceira linha de defesa do organismo. Estes atuam reparando lesões, eliminando resíduos ou reconstituindo funções perdidas (*e.g.*, proteases, fosfolipases e transferases). Por último, os antioxidantes de adaptação, que constituem uma quarta linha de defesa, exercem uma função de adaptação, em que cada antioxidante é produzido na altura certa e transferido na quantidade necessária para as posições adequadas (Niki, 2010).

A exposição do organismo a radicais livres, provenientes de diversas fontes, levou o organismo a desenvolver mecanismos de defesa (defesas endógenas) para eliminar estes radicais livres (Ferreira & Abreu, 2007). As defesas antioxidantes podem ser enzimáticas ou não enzimáticas (Carocho & Ferreira, 2013).

As defesas antioxidantes enzimáticas são em grande número e encontram-se espalhadas por todo o organismo, tanto no meio intracelular como no meio extracelular. Exemplos destas defesas são a SOD, CAT, a glutathiona peroxidase (GSH-Px), a glutathiona redutase (GSH-R), entre outras (Ferreira & Abreu, 2007).

Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas destacam-se compostos como a glutathiona, o α -tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), o ácido lipoico, os carotenoides, os flavonoides, entre outros (Ferreira & Abreu, 2007; Valko et al., 2007).

Para além destas defesas endógenas, existe uma panóplia de moléculas naturais, de origem vegetal, com propriedades antioxidantes e que podem constituir um sistema exógeno de defesa, as quais designamos de fitoquímicos (Ferreira & Abreu, 2007).

Os fitoquímicos são classificados como compostos bioativos provenientes de diferentes partes das plantas, tais como, sementes, cereais, vegetais, frutos, folhas, raízes, especiarias e ervas (Ferreira & Abreu, 2007; Skerget et al., 2005), e estão relacionados com a redução do risco de ocorrência de várias doenças crónicas, nomeadamente vários tipos de cancro.

Sendo o stresse oxidativo induzido por radicais livres, responsável por várias dessas doenças crónicas, os fitoquímicos presentes em frutos e vegetais assumem cada vez mais uma enorme importância (Ferreira & Abreu, 2007; Liu, 2003).

Além da importância dos fitoquímicos na dieta, quando presentes ou adicionados a alimentos, exercem igualmente um efeito protetor; preservam as propriedades organolépticas e nutricionais, prolongam o prazo de validade e previnem a formação de produtos de decomposição oxidativa pela ação da luz, temperatura e humidade. Assim, os compostos bioativos são de grande importância no setor alimentar e biotecnológico podendo ser usados em diversas aplicações, principalmente no desenvolvimento de aditivos alimentares, nutracêuticos, alimentos funcionais e fármacos (Loziene et al., 2007).

1.2. As plantas medicinais

Os saberes sobre as plantas têm acompanhado a evolução do homem ao longo dos tempos. Cedo as civilizações mais primitivas se aperceberam do interesse das plantas, tanto para a alimentação como para a saúde e bem-estar. Inicialmente, a utilização de plantas medicinais no tratamento de doenças era feita de forma empírica. Por exemplo, acreditava-se ser possível intuir as propriedades das plantas a partir das suas características morfológicas, atendendo, por exemplo, à forma das folhas e dos frutos, e às suas semelhanças com partes ou órgãos do corpo humano. Quanto maior a similitude, maiores os efeitos sobre o organismo. À medida que se acumularam experiências, foram sendo selecionadas as plantas que apresentavam maior eficácia no controlo ou cura das doenças (Cunha, 2010).

A informação acerca das plantas e dos usos medicinais começou por ser transmitida oralmente, de geração em geração, para depois, com o aparecimento da escrita, ter passado a ser compilada e guardada em documentos preciosos (Cunha, 2005).

A descoberta de novas moléculas ativas tem por base os conhecimentos inventariados pelas metodologias da etnobotânica, disciplina que estuda as plantas usadas tradicionalmente por vários povos, e os registos no âmbito da etnofarmacologia que recolhe e analisa as práticas tradicionais de preparação e uso de medicamentos à base de plantas, pelas civilizações e comunidades que recorriam ou recorrem apenas à natureza, para tratar diversas patologias (Gomes, 2005; Maciel et al., 2002).

A recolha dos saberes empíricos e a interdisciplinaridade que caracteriza a etnobotânica e a etnofarmacologia (os estudos integram equipas multidisciplinares e trabalhos do âmbito da botânica, química, farmacologia e toxicologia) são fundamentais na obtenção de matéria-prima vegetal para a produção de produtos fitoterapêuticos e isolamento de novos fármacos e/ou protótipos de novos fármacos (Foglio et al., 2006).

Na procura de novas moléculas naturais bioativas, dá-se preferência ao estudo de plantas que pelo seu uso na medicina popular, já provaram exibir atividade farmacológica (Krishnaiah et al., 2011; Montanher et al., 2002). Parte deste poder medicinal advém do elevado potencial destas espécies para neutralizar os radicais livres responsáveis pelos danos celulares (Mantle et al., 2000).

Depois de um período de desinteresse, em que se privilegiaram os compostos sintéticos, ressurgiu em 1980 o interesse por medicamentos à base de plantas principalmente na Alemanha, França e no Reino Unido, passando posteriormente a outros países europeus e à América do Norte (Cunha, 2005).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), atualmente, 80% da população humana recorre à fitoterapia para tratar problemas de saúde sendo que, desse total, pelo menos 30 % desses usos são por indicação médica (Novais et al., 2004).

Em particular, as plantas podem constituir fontes de compostos antioxidantes suplementados através da alimentação e de outros usos (Krishnaiah, 2011).

As plantas medicinais têm sido um recurso precioso para a obtenção de moléculas com potencial terapêutico, mas a sua utilização pela indústria farmacêutica é relativamente recente. O estudo e a investigação sobre plantas e compostos derivados com potencial efeito no tratamento de algumas doenças teve início no século XIX, mas a identificação de compostos isolados, em termos de estrutura química, teve lugar já no século XX. Este processo de descoberta de novos compostos tem estado em permanente evolução devido ao aperfeiçoamento das técnicas que permitem o isolamento e a determinação estrutural dos compostos químicos (Costa & Teixeira, 2007).

Rubus ulmifolius Schott (silva-brava) da família das Rosaceae é uma planta medicinal da flora silvestre portuguesa. Esta espécie é frequente na Península Ibérica, cresce de forma espontânea em condições de clima mediterrânico e é vulgarmente utilizada na medicina popular (Carvalho, 2010). A **Tabela 1** resume os usos medicinais desta espécie mencionados em inventários etnobotânicos realizados recentemente na Península Ibérica.

Em Portugal, a sabedoria popular considera que as infusões e as decocções dos gomos de *R. ulmifolius* têm propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (Camejo et al., 2003; Carvalho, 2010; Neves et al., 2009; Novais et al., 2004). Tendo em conta potenciais propriedades terapêuticas de *R. ulmifolius*, preparam-se infusões a partir das folhas jovens e dos botões florais depois de secos, que são administradas por via oral para tratamento de diabetes, diarreia, menopausa. Também se aplicam externamente para alívio de rouquidão, gengivas inflamadas, aftas e bálsamo de úlceras cutâneas (Acqua et al., 2008).

Sabe-se que estes materiais vegetais contêm grandes quantidades de antocianinas, que são poderosos antioxidantes que ajudam a reverter os danos celulares causados pelos radicais livres, e são úteis na prevenção de doenças cardíacas, do foro cancerígeno e vascular (Novais et al., 2004).

Estudos recentes descobriram que a amora, o fruto da silva-brava, devido ao seu alto teor em flavonoides, entre outras propriedades, tem ação digestiva e antiespasmódica, tonificante, antisséptica, tranquilizante e analgésica, sobretudo a nível local e das mucosas do aparelho digestivo (Novais et al., 2004). A amora-preta é considerada um fruto funcional, ou seja, além das características nutricionais básicas, quando consumida como componente frequente da dieta, produz efeito fisiológico/metabólico ou efeito benéfico para a saúde humana, cujo consumo é considerado seguro, não necessitando por isso de supervisão médica (Vizzoto, 2008).

Tabela 1. Usos medicinais da espécie estudada, referidos em inquéritos etnobotânicos realizados recentemente na Península Ibérica.

Nome científico	Nome vernáculo	Indicações	Propriedades terapêuticas	Preparação
<i>Rubus ulmifolius</i> Schott	Silva	Hipertensão, aparelho digestivo, dor de garganta, catarro	Antidiarreico, antisséptico, anti-inflamatório, antiespasmódico e analgésico.	Administração oral: Infusão ou decocção das folhas jovens (Camejo et al., 2003; Carvalho, 2010; González et al., 2010; Novais et al., 2004).

1.3. Caracterização botânica da planta em estudo, *Rubus ulmifolius* Schott

R. ulmifolius (**Figura 3**), vulgarmente conhecida por silva brava ou silva-gravanceira, é uma espécie da família botânica das Rosaceae. Nativa da Europa e regiões temperadas da Ásia e África do Norte, a silva é um arbusto lenhoso e perene que cresce nas orlas de bosques, sebes, margens de caminhos e terrenos incultos e abandonados.

Forma caules jovens, compridos e arqueados (turiões), munidos de acúleos falciformes e retos, cobertos de substância cerosa esbranquiçada (pruína). As folhas são compostas, com três a cinco folíolos que partem do mesmo ponto, também pruinosas.

As flores, agrupadas em inflorescências piramidais, são hermafroditas com pétalas de cor rosada escura a quase branca. Os frutos, as deliciosas amoras silvestres, são do tipo drupa, carnudos e com pequeno caroço, coerentes, vermelhos tornando-se pretos quando maduros.

R. ulmifolius é popularmente utilizado para diversos fins desde há longo tempo.

Particularmente interessantes são os seus usos medicinais e alimentares em que se empregam as folhas antes da floração, os botões florais e os frutos (Monasterio-Huelin, 2001).



Figura 3. *Rubus ulmifolius*, Schott detalhe da folha (A) detalhe da flor (B) e do fruto (C). (Flora-on, 2013). Fotos de: Porto, M., Aguiar, C. (CIMO), Pereira, A. J.)

1.4. Constituintes bioativos das plantas

As plantas são uma fonte natural de compostos bioativos eficazes, que podem ser aplicados, por exemplo, como aditivos alimentares e como ingredientes na formulação de alimentos funcionais e nutracêuticos (Loziene et al., 2007).

Barros et al. (2010) concluíram que as flores *R. ulmifolius* possuem propriedades antioxidantes devido aos compostos bioativos nomeadamente: fenóis, flavonoides, ácido ascórbico e licopeno. As folhas de *R. ulmifolius* também demonstraram propriedades antioxidantes sobretudo devido à presença de ácido cafeico, ácido ferúlico, ésteres químicos de ácido cafeico, bem como à quercetina-3-*O*-glucurónido e ao canferol-3-*O*-glucurónido e ácido elágico (Acqua, 2008).

A planta em estudo pode ter aplicação na prevenção de doenças crónicas relacionadas com o stresse oxidativo, uma vez que os seus constituintes apresentam propriedades antioxidantes nomeadamente, atividade captadora de radicais livres, podendo ser incluídas em formulações de nutracêuticos ou consumidas como alimentos funcionais devido às suas características nutricionais.

Os compostos fenólicos, em particular, estão presentes em todos os frutos e vegetais. Devido à sua ampla distribuição na natureza, constituem um dos grupos mais numerosos de metabolitos. Resultantes do metabolismo secundário das plantas, os compostos fenólicos compreendem um grupo heterogéneo de substâncias, umas com estruturas relativamente simples e outras mais complexas. Estes compostos caracterizam-se pela existência de um anel aromático, ao qual está ligado um ou mais grupos hidroxilo, livres ou envolvidos numa ligação éter, éster ou heterosídica (Cunha, 2005).

São também definidos como compostos não azotados com um ciclo aromático, que derivam do metabolismo do ácido chiquímico e/ou de um poliacetato. Esta definição resulta da sua origem biossintética em que se distinguem duas vias anabólicas:

- a via do ácido chiquímico (mais comum), que resulta da condensação do fosfoenolpiruvato com a eritrose-4-fosfato e dá origem aos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina. Estes aminoácidos, por desaminação, originam ácidos cinâmicos que entram na via fenil propanoide;

– a via do acetato, em que os compostos fenólicos se formam por ciclização de um poli- β -cetoéster. Habitualmente, os compostos fenólicos encontram-se na natureza na forma conjugada, principalmente com moléculas de açúcar ligadas ao hidroxilo fenólico (*O*-heterósidos) ou, mais raramente, ao anel benzénico (*C*-heterósidos) (Cunha, 2005).

Os compostos fenólicos fazem parte da dieta e parecem estar associados a benefícios para a saúde humana, nomeadamente no tratamento e prevenção do cancro, doenças cardiovasculares e outras patologias, devido sobretudo à sua capacidade antioxidante (Barbaste et al., 2002; Urquiaga & Leighton, 2000).

1.5. Alimentos funcionais e nutracêuticos

A alimentação equilibrada tem um papel importante na manutenção da saúde. Assim, há uma procura cada vez maior de alimentos que satisfaçam as necessidades nutricionais básicas ou que desempenhem efeitos fisiológicos benéficos para a saúde do consumidor, o que gerou um aumento dos esforços da comunidade científica que tem produzido inúmeros estudos com o intuito de comprovar a atuação de certos alimentos na prevenção de doenças (Proskey, 2001).

O conceito de alimentos funcionais surgiu inicialmente no Japão na década de 80 através da publicação de regulamentação de alimentos para uso específico da saúde (Pinto, 2010).

Alimento funcional é considerado como sendo “qualquer alimento, natural ou preparado, que contenha uma ou mais substâncias, classificadas como nutrientes ou não nutrientes, capazes de atuar no metabolismo e na fisiologia humana, promovendo efeitos benéficos para a saúde, podendo retardar o desenvolvimento de doenças crónicas e degenerativas e melhorar a saúde e a expectativa de vida das pessoas” (Pinto, 2010).

Os efeitos benéficos para a saúde dos alimentos funcionais devem-se à presença de uma ou mais substâncias fisiologicamente ativas que devem estar presentes nos alimentos, em quantidades suficientes e adequadas para produzir o efeito fisiológico desejado (Pinto, 2010).

Os alimentos funcionais devem ser sempre consumidos na dieta normal e devem aumentar o bem-estar e a saúde e/ou reduzir o risco de ocorrência de doenças, além do seu valor nutritivo básico (Pinto, 2010).

Por sua vez, o nutracêutico é um alimento ou parte de um alimento que proporciona benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento da doença. Tais produtos podem abranger desde os nutrientes isolados, suplementos dietéticos na forma de cápsulas e até aos alimentos processados tais como cereais, sopas e bebidas (Roberfroid, 2002).

As plantas são uma fonte natural de compostos bioativos eficazes, que podem levar ao desenvolvimento de nutracêuticos e fármacos com ação anti-inflamatória, digestiva, antinecrótica, neuroprotetora e hepatoprotetora, podendo envolver um mecanismo antioxidante e/ou captador de radicais livres (Loziene et al., 2007).

Uma ingestão elevada de alimentos ricos em antioxidantes naturais aumenta a capacidade antioxidante do plasma e reduz o risco de alguns tipos de cancro, doenças cardiovasculares e acidente vascular cerebral (Hassimoto et al., 2009; Justesen & Knuthsen, 2001). Estas propriedades são atribuídas a vários constituintes, incluindo vitaminas e numerosos fitoquímicos, principalmente compostos fenólicos como os flavonoides (Hassimoto et al., 2009; Justesen & Knuthsen, 2001). Os compostos antioxidantes podem funcionar ou atuar contra as ROS de maneira diferenciada tendo uma ação quelante e/ou captadora dos radicais antes da ocorrência de danos em qualquer parte do organismo; após estes danos, podem também funcionar como reparadores dos tecidos (Niki, 2010).

A planta em estudo pode ser considerada alimento funcional ou fonte de nutracêutico uma vez que de acordo com estudos anteriores (Barros et al., 2010), apresenta propriedades antioxidantes e compostos bioativos nomeadamente, polifenóis, vitaminas, carotenoides, ácidos gordos insaturados e açúcares redutores. No entanto, deve ser referido que esses estudos foram feitos em extratos metanólicos e não na forma em que as plantas são normalmente consumidas: infusões e decocções.

1.6. Microencapsulação

A microencapsulação é uma técnica que permite o desenvolvimento de formulações, onde o seu conteúdo é protegido e a sua libertação modificada com o objetivo de atuar num determinado local, por um determinado período de tempo e a uma velocidade específica (Suave et al., 2006). Apresenta importantes aplicações, principalmente nas áreas farmacêuticas, cosmética e alimentar (Nedovic et al., 2011).

É um processo em que as substâncias de interesse, designadas de compostos bioativos, são incorporadas numa matriz ou num sistema de revestimento, obtendo-se micropartículas com um diâmetro que varia entre 1 a 1000 μm .

As substâncias a encapsular apresentam-se geralmente no estado líquido ou sólido, podendo também ser um gás (Schrooyen et al., 2001).

Esta técnica é aplicada no setor alimentar, com vários propósitos, nomeadamente (Nedovic et al., 2011):

1. Melhorar as propriedades do material encapsulado, mascarando as características organolépticas desagradáveis (sabores, odores, cor) de alguns materiais;
2. Possibilitar a otimização de formulações no que se refere à modulação da libertação da substância a encapsular;
3. Estabilizar a substância a encapsular, evitando as reações de degradação decorrentes das condições adversas ao longo do trato gastrointestinal (pH e enzimas);
4. Reduzir efeitos adversos provocados por algumas substâncias;
5. Diminuir a toxicidade do composto bioativo;
6. Controlar a biodisponibilidade;
7. Proteger os compostos voláteis, impedindo a sua perda;
8. Proteger as substâncias dos agentes atmosféricos (luz, humidade, calor e oxigénio).

Para além das várias vantagens desta técnica, é importante também salientar algumas limitações, como por exemplo, o elevado custo e por vezes a dificuldade de escolha do método a aplicar no encapsulamento das substâncias devido à ausência de um processo adaptável universalmente a todas as substâncias (Venkatesan, 2009).

Existem vários métodos usados para a preparação de micropartículas, no entanto, a escolha do método mais adequado depende de alguns fatores, como por

exemplo, das propriedades do material a encapsular, das condições de produção e dos requisitos do produto final (Bansode et al., 2010).

As micropartículas servem para transportar vários compostos bioativos, tais como fármacos, vitaminas, DNA, péptidos, aromatizantes, corantes, óleos essenciais e nutrientes (Bansode et al., 2010). Relativamente à sua estrutura interna e morfologia, as micropartículas podem ser divididas em dois grupos principais: as microcápsulas e as microesferas. Estes podem depois subdividir-se em outras classes tal como apresentado na **Figura 4** (Silva et al., 2003).

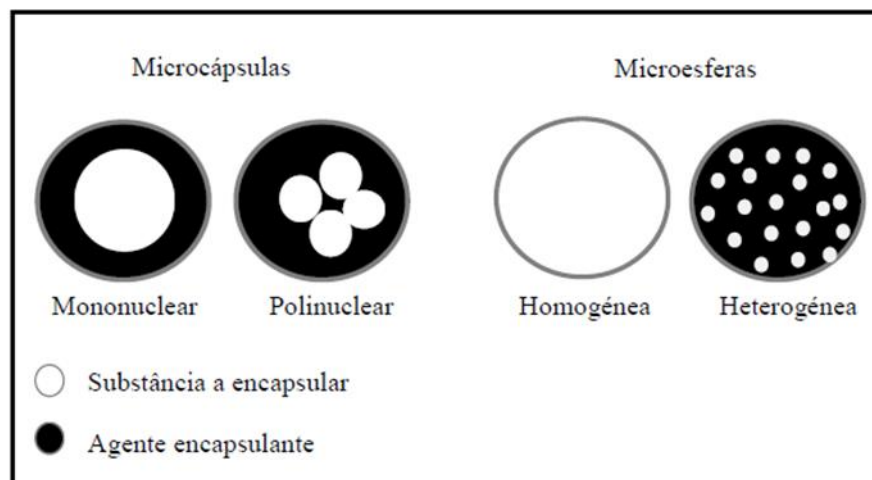


Figura 4. Estrutura das micropartículas (adaptado de Silva et al., 2003).

1.6.1. Agente encapsulante

No processo de microencapsulação, a variedade de materiais encapsulantes é muito vasta. Estes têm como principal função proteger o composto bioativo sob a forma de um invólucro ou matriz (Azeredo, 2005).

Os agentes encapsulantes podem apresentar diferentes origens desde natural, semi-sintética ou sintética (Anson, 2005). Na **Tabela 2** estão referenciados alguns exemplos de agentes encapsulantes classificados de acordo com a sua origem.

Tabela 2. Exemplos de agentes encapsulantes usados na microencapsulação de acordo com a sua origem (adaptado de Anson, 2005).

Tipos de agentes encapsulantes	Exemplos
Naturais	Gelatina, goma agar-agar, alginato de sódio, alginato de cálcio, dextrano, quitosano, caseinato, sacarose e cera
Semi-Sintéticos	Acetato de celulose, nitrato de celulose, etilcelulose, hidroxipropilcelulose, metilcelulose, carboximetilcelulose de sódio, álcool miristílico, gliceril mono ou dipalmitato, mono, di e triestearato de glicerol
Sintéticos	Polímeros do ácido acrílico e co-polímeros

Um dos principais fatores que influencia a estabilidade do composto encapsulado é o tipo de agente encapsulante utilizado na microencapsulação. A escolha do agente encapsulante deve basear-se em alguns critérios, nomeadamente nas características físicas e químicas do composto bioativo a encapsular (e.g. solubilidade), no tipo de aplicação pretendida (e.g. fármaco, aditivo alimentar, fragrância) e no método de microencapsulação selecionado (Suave et al., 2006).

Nas indústrias alimentares e farmacêuticas têm sido muito utilizados polímeros naturais tais como o alginato e o quitosano. Os alginatos são polissacarídeos naturais, extraídos de algas e de algumas bactérias, são biodegradáveis, biocompatíveis e atóxicos (Wong et al. 2011). Para além da área alimentar, possuem outras aplicações, particularmente nas áreas biotecnológicas e farmacêutica.

O quitosano é um polissacarídeo obtido por desacetilação alcalina da quitina, tendo sido alvo de variados estudos devido às suas excelentes propriedades como a bioatividade, biocompatibilidade e biodegradabilidade (Pinto, 2005).

1.6.2. Métodos de microencapsulação

O método de microencapsulação deve ser simples, reproduzível, rápido e facilmente transponível para a escala industrial (Silva et al., 2003).

A seleção do método de microencapsulação depende de alguns aspetos, tais como, as propriedades físico-químicas, tanto do material a encapsular como do agente encapsulante (principalmente, a solubilidade); a aplicação ou finalidade das micropartículas produzidas; o tamanho, textura e forma da micropartícula e o mecanismo de libertação pretendido (Bansode et al., 2010).

Os métodos correntemente mais utilizados podem ser divididos em três grupos principais: métodos químicos, físicos e físico-químicos (Suave et al., 2006). A **Tabela 3** mostra um resumo dos métodos existentes agrupados pelas três categorias descritas.

Tabela 3. Métodos utilizados na elaboração das microcápsulas (adaptado de Suave et al., 2006).

Tipo	Método
Métodos Físicos	<i>Spray drying</i>
	<i>Spray cooling</i>
	Técnica de leito fluidizado
	Co-extrusão
Métodos Químicos	Polimerização <i>in-situ</i>
	Inclusão molecular
	Polimerização interfacial
Métodos Físico-Químicos	Coacervação ou separação de fases
	Emulsificação/evaporação do solvente
	Pulverização em solução com agente de reticulação

A técnica mais utilizada para o processo de microencapsulação na indústria alimentar é o *spray drying*. É considerado um processo económico, flexível, utiliza um equipamento fácil de manusear originando partículas de boa qualidade (Fang & Bhandari, 2010).

Existem outras variantes desta técnica nomeadamente a técnica de atomização (spray) seguida de coagulação. Esta apresenta a vantagem de não utilizar temperaturas elevadas comparativamente com o *spray drying*. Esta técnica será a escolhida para utilizar neste trabalho.

1.6.3. Técnica de atomização/coagulação

A técnica de atomização facultada pelo equipamento NISCO Var J30 (equipamento a ser utilizado no presente trabalho) pode ser descrita como sendo constituída por um controlador de pressão ligado a uma fonte de gás (azoto) e uma bomba seringa para controlo do caudal da solução. Estes componentes alimentam o bico atomizador (*nozzle*), onde ocorre a formação do *spray*. As micropartículas são consolidadas logo após a sua formação por contato com a solução de agente de coagulação. Relativamente à produção de microesferas, este sistema requer a otimização do caudal de alimentação da emulsão ou solução ao *nozzle* e da pressão de saída do gás (Fernandes et al., 2011).

Na **Figura 5** apresenta-se de forma esquemática e em fotografia o dispositivo experimental Nisco Var J30.

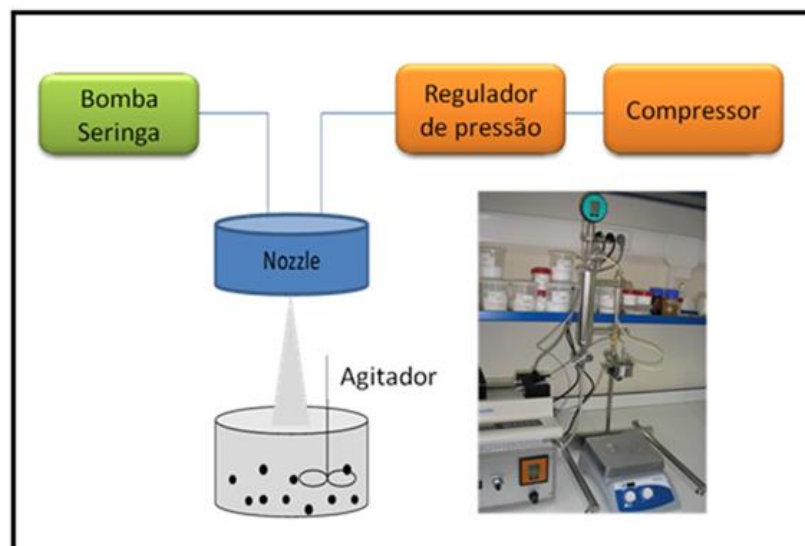


Figura 5. Esquema e fotografia do sistema NiscoVar J30 (adaptado de Fernandes et al., 2011).

Na **tabela 4** apresenta um resumo com exemplos de microencapsulação de princípios ativos contendo extratos fenólicos com interesse na área alimentar.

Tabela 4. Exemplos de microencapsulação de princípios ativos contendo extratos fenólicos com interesse na área alimentar.

Princípio ativo	Material	Técnica	Referência
<i>Opuntia ficus-indica</i> (Extrato etanólico)	Maltodextrina, Inulina	<i>Spray drying</i>	(Saézn et al., 2009)
Própolis (Extrato etanólico)	Proteína isolada de soja e pectina	Coacervação complexa, <i>Freeze drying</i>	(Nori et al., 2011)
<i>Quercus resinosa</i> (Extrato da infusão das folhas)	Maltodextrina, k-carragenano	<i>Spray drying</i>	(Gallegos-Infante et al., 2013)
<i>Ilex paraguariensis</i> (Extrato aquoso)	Alginato, Alginato+quitosano	<i>Spray drying</i>	(Deladino et al., 2008)
<i>Capsicum annum</i> L. (Extrato de sementes, pele)	Goma-arábica	<i>Spray drying</i>	(Romo-Hualde et al., 2012)
<i>Morinda citrifolia</i> L. (Extrato do fruto)	k-carragenano, Maltodextrina	<i>Spray drying</i>	(Krishnaiah et al., 2012)
<i>Rubus idaeus</i> L. (Extrato aquoso das folhas)	Alginato+quitosano	Extrusão eletrostática	(Belščak-Cvitanović et al., 2011)
<i>Daucus carota</i> L. (Extrato etanólico)	Maltodextrinas (MDX, stardri 10, glucodry 10)	<i>Spray drying</i>	(Ersus & Yurdagel, 2007)
<i>Myrciaria jaboticaba</i> (Extrato das cascas)	Maltodextrina, Goma-arábica+ Maltodextrina, Amido modificado+ Maltodextrina	<i>Spray drying</i>	(Silva et al., 2013)
<i>Lippia sidoides</i> (Extrato etanol:H ₂ O)	Maltodextrina, Goma-arábica	<i>Spray drying</i>	(Fernandes et al., 2012)
<i>Punica granatum</i> L. (Extrato aquoso das cascas)	Maltodextrina	<i>Spray drying</i>	(Çam et al., 2013)
<i>Piper sarmentosum</i> (Extrato aquoso)	Alginato	Extrusão	(Chan et al., 2010)
<i>Garcinia cowa</i> (Extrato aquoso do fruto)	Maltodextrina	<i>Freeze drying</i>	(Ezhilarasi et al., 2013)

1.7. Objetivos

A maioria dos usos descritos para a planta em estudo resulta de situações empíricas recolhidas numa perspetiva etnobotânica e etnofarmacológica. Partindo do pressuposto de que o uso empírico destas espécies e os saberes e práticas a elas associados foram ratificados e confirmados ao longo de gerações de consumidores, é de considerar que a espécie em estudo têm um potencial fitoquímico e fitofarmacológico que interessa avaliar e explorar.

Assim, este trabalho teve como objetivos:

i) Avaliar a atividade antioxidante e caracterizar quimicamente extratos fenólicos obtidos a partir de material vegetal proveniente de uma espécie silvestre de uso frequente na medicina tradicional Transmontana: *Rubus ulmifolius* (Rosaceae).

ii) Testar a aplicação destes extratos para fins nutracêuticos, através do processo de microencapsulação e posterior incorporação em iogurte, tendo presente a promoção de produtos alimentares com benefícios para a saúde.

iii) Contribuir para a valorização da flora medicinal silvestre e validação das práticas tradicionais.

II. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Para a realização deste trabalho foi selecionada uma planta medicinal da família Rosaceae, *Rubus ulmifolius* Schott, vulgarmente conhecida pelo nome vernáculo de silva brava ou silva gravanceira.

Os botões florais de *R. ulmifolius* foram recolhidas no final da primavera de 2009, em zonas marginais (orlas de bosques e caminhos rurais) do território do Parque Natural de Montesinho, Trás-os-Montes, nordeste de Portugal, considerando a farmacopeia popular Portuguesa, os critérios de uso medicinal local e os padrões de crescimento das plantas.

A identificação botânica da espécie foi confirmada com os caracteres morfológicos definidos pela Flora Ibérica, volume VI, Rosaceae (Castroviejo cord, 2001) e pela Nova Flora de Portugal (Franco, 1994). Exemplares prensados e montados encontram-se depositados no Herbário da Escola Superior Agrária de Bragança (BRESA).

As amostras foram liofilizadas usando o equipamento FreeZone 4.5 (Labconco, Kansas, EUA), reduzidas a pó e mantidas nas melhores condições, a -20°C, para a utilização subsequente.

2.2. Solventes, reagentes e padrões

O solvente acetonitrilo, de grau HPLC, foi fornecido pela Merck KgaA (Darmstadt, Alemanha). Os ácidos fórmico e acético foram adquiridos à Prolabo (VWR International, França).

O padrão utilizado nos ensaios de atividade antioxidante (trolox: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) foi adquirido na Matreya (PA, EUA).

O 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido na Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA). Os padrões de compostos fenólicos foram fornecidos pela Extrasynthèse (Genay, França). Todos os outros produtos químicos usados eram de grau analítico e foram adquiridos a partir de fornecedores de produtos químicos. A água foi tratada com um sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water Systems, EUA).

2.3. Procedimentos de extração de compostos fenólicos

2.3.1 Decocção

A decocção foi preparada a partir do material vegetal liofilizado (1 g), adicionando 200 mL de água destilada e aquecendo (placa de aquecimento, VELP Scientific) até à ebulição durante 5 min. Deixou-se repousar a mistura durante mais 5 min e depois filtrou-se sob pressão reduzida. A decocção obtida foi congelada e liofilizada usando o equipamento mencionado anteriormente.

2.3.2. Maceração numa mistura hidroalcoólica

A extração hidroalcoólica foi realizada a partir do material vegetal liofilizado (1 g) com 30 mL de metanol: água (80:20, v/v) a 25°C sob agitação a 150 rpm durante 1h, sendo subsequentemente filtrada através de papel Whatman N°4. O resíduo obtido foi, em seguida, extraído com uma porção adicional de 30 mL da mistura hidroalcoólica. Os extratos hidroalcoólicos combinados foram evaporados a 35°C sob pressão reduzida (evaporador rotativo Buchi R-210, Flawil, Suíça) e posteriormente liofilizados.

O extrato hidroalcoólico e a decocção liofilizada foram re-dissolvidos numa mistura metanol: água (80:20, v/v) e água, respetivamente (concentração final de 2,5 mg/mL), para determinação de compostos fenólicos. As soluções finais foram ainda diluídas para diferentes concentrações e submetidas a ensaios de avaliação de atividade antioxidante.

2.4. Caracterização da composição dos extratos em compostos fenólicos

As soluções stock preparadas foram filtradas através de discos descartáveis LC de 0,22- μ m e analisadas num cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 (Agilent Technologies) com uma bomba quaternária e um detetor de díodos (DAD) acoplado com uma estação de processamento de dados HP Chem Station (rev. A.05.04). Utilizou-se uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C₁₈, 3 μ m (4,6 mm \times 150 mm) termostaticada a 35°C. A fase móvel foi (A) 0,1% de ácido fórmico em água, (B) acetonitrilo. O gradiente de eluição estabelecido foi de 10% B a 15% B até 5 min, 15-

25% B mais 5 min, 25-35% B mais 10 min, isocrático 50% B mais 10 min e reequilíbrio da coluna; usou-se uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. Realizou-se uma detecção dupla online DAD a 280 nm e 370 nm como comprimentos de onda preferenciais e no espectrómetro de massa (MS) ligado ao sistema de HPLC.

A detecção MS foi realizada num API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemanha) equipado com uma fonte ESI num analisador de massa de armadilha de ião-quadrupolo tripla, controlada pelo software Analyst 5.1. Usou-se ar de grau zero (30 psi) como gás de nebulização e gás turbo para secagem do solvente (400°C, 40 psi). O azoto serviu como cortina (20 psi) e gás de colisão (médio). A tensão de *spray* dos iões foi definida a -4500V em modo negativo. O detetor MS foi programado para executar, em série, dois modos consecutivos: incrementar a análise do MS (EMS) e do ião produto (EPI). O sistema EMS foi utilizado para mostrar espectros de varrimento completo, para dar uma visão geral a todos os iões na amostra. As configurações usadas foram: potencial de não-cluster (DP) -450V, potencial de entrada (EP) -6V, energia de colisão (CE) -10V. O modo EPI foi executado, posteriormente, de modo a obter os padrões de fragmentação dos iões obtidos da experiência anterior, usando os seguintes parâmetros: DP -50 V, EP -6 V, CE -25V e dissipação da energia de colisão (CES) 0 V. Os espectros foram gravados no modo de ião negativos entre m/z 100 e 1700.

Os compostos fenólicos presentes nos extratos foram caracterizados de acordo com o seu espectro UV e de massa, e tempo de retenção em comparação com padrões, quando disponíveis. Para análise quantitativa, obtiveram-se as curvas de calibração por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas (2,5-100 µg/mL): Catequina ($y=158,42x-11,38$; $R^2=0,9999$); ácido clorogénico ($y=600,27x-763,62$; $R^2=0,9998$); ácido *p*-cumárico ($y=884,6x+184,49$; $R^2=0,9999$); ácido elágico ($y=32,72x+77,8$; $R^2=0,9999$); ácido ferúlico ($y=505,97x-64,578$; $R^2=0,9999$); canferol 3-*O*-glucósido ($y=190,75x-36,158$; $R^2=1,000$); canferol 3-*O*-rutinósido ($y=175,02x-43,877$; $R^2=0,9999$); quercetina 3-*O*-glucósido ($y=316,48x-2,9142$; $R^2=1,000$); quercetina 3-*O*-rutinósido ($y=222,79x-243,11$; $R^2=0,9998$). Os resultados foram expressos em mg por 100 g de massa seca.

2.5. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

2.5.1. Atividade captadora de radicais DPPH

Esta metodologia foi realizada utilizando um Leitor de Microplacas ELX800 (Bio-Tek equipamento, Inc.). A mistura reativa, em cada um dos 96 poços, consistiu nas diferentes concentrações do extrato (30 µL) às quais se adicionou uma solução metanólica (270 µL) contendo radicais DPPH (6×10^{-5} mol/L). A mistura foi deixada em repouso durante 30 min no escuro. A redução do radical DPPH foi determinada pela medição da absorvância a 515 nm. A atividade captadora de radicais (ACR) foi calculada pela percentagem de descoloração da solução de DPPH, usando a equação:

$$\% \text{ ACR} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{S}})/A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

onde A_{S} corresponde à absorvância da solução de DPPH na presença de diferentes concentrações de extrato e A_{DPPH} é a absorvância do branco (solução de DPPH mais o solvente de extração (metanol) em vez da solução de extrato).

A concentração de extrato que fornece 50% da atividade captadora de radicais (EC_{50}) foi calculada a partir do gráfico de ACR em função da concentração de extrato. O padrão utilizado foi o trolox.

2.5.2. Poder redutor

Esta metodologia foi realizada utilizando o Leitor de Microplacas descrito anteriormente. As diferentes soluções de extrato (0,5 mL) foram misturadas com tampão fosfato de sódio (200 mmol/L, pH 6,6, 0,5 mL) e ferricianeto de potássio (1% w/v, 0,5 mL). A mistura foi incubada a 50°C durante 20 min. Após esse período adicionou-se ácido tricloroacético (10% w/v, 0,5 mL). A mistura (0,8 mL) foi colocada nos 48 poços juntamente com água desionizada (0,8 mL) e cloreto de ferro (0,1% w/v, 0,16 mL), e a absorvância foi medida a 690 nm. Foi preparado um branco com o solvente de extração (metanol) em vez da solução de extrato.

A concentração de extrato com 0,5 de absorvância (EC_{50}) foi calculada a partir do gráfico de absorvância a 690 nm em função da concentração do extrato. O padrão utilizado foi o trolox.

2.5.3. Inibição da descoloração do β -caroteno

Preparou-se, por dissolução, uma solução de β -caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 mL). Transferiram-se 2 mL desta solução para um balão de fundo redondo e evaporou-se a 40°C sob vácuo, para remoção do clorofórmio. Adicionou-se ácido linoleico (40 mg), emulsionante Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 mL), agitando vigorosamente.

Transferiu-se uma alíquota (4,8 mL) desta emulsão para tubos de ensaio contendo 0,2 mL das diferentes concentrações dos extratos, leu-se a absorvância a 470 nm no tempo zero usando um espectrofotómetro (Analytikjena, Jena, Alemanha), e incubou-se a 50°C em banho-maria sob agitação. Após 2h de incubação, mediu-se novamente a absorvância. A inibição da descoloração do β -caroteno foi calculada utilizando a equação: (conteúdo de β -caroteno após 2h de ensaio/conteúdo inicial de β -caroteno) \times 100.

A concentração de extrato que origina 50% de atividade antioxidante (EC_{50}) foi calculada por interpolação a partir do gráfico de percentagem da inibição da descoloração do β -caroteno em função da concentração de extrato. O padrão utilizado foi o trolox.

2.5.4. Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Utilizou-se tecido cerebral, obtido a partir de porco (*Sus scrofa*), que foi dissecado e homogeneizado com uma Polytron em gelo com tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) a fim de produzir um homogeneizado de tecido cerebral numa proporção 1:2 (w/v) após centrifugação (centrífuga refrigerada Centorion K24OR) a 3000g durante 10 min. Incubou-se uma alíquota (0,1 mL) do sobrenadante com as diferentes concentrações dos extratos (0,2 mL), na presença de $FeSO_4$ (10 μ M; 0,1 mL) e ácido ascórbico (0,1 mM; 0,1 mL) a 37 °C durante 1h. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (28% w/v; 0,5 mL), seguindo-se a adição do ácido tiobarbitúrico (TBA; 2%, w/v; 0,38 mL). A mistura foi aquecida a 80 °C durante 20 min. Após centrifugação, a 3000g durante 10 min, para remoção do precipitado de proteínas, a intensidade da cor do complexo malonaldeído (MDA)-TBA do

sobrenadante foi medida através da sua absorvância a 532 nm. A percentagem de inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = [(A - B)/A] \times 100\%,$$

onde A e B corresponde à absorvância do branco e da solução com o extrato, respetivamente. A concentração de extrato que fornece 50% de inibição da peroxidação lipídica (EC₅₀) foi calculada a partir do gráfico da percentagem de inibição da formação de TBARS em função da concentração de extrato. O padrão utilizado foi o trolox.

2.6. Microencapsulação do extrato hidroalcoólico de *R. ulmifolius*

O processo de produção das microesferas foi realizado através do método de atomização/coagulação utilizando o sistema NISCO Var J30, e o seguinte sistema químico:

- Material de suporte – alginato utilizado sob a forma de solução aquosa a 4% (w/v);
- Princípio ativo – extrato hidroalcoólico de *R. ulmifolius* na sua forma liofilizada;
- Solução de coagulação – solução CaCl₂ a 4% (w/v).

O procedimento experimental utilizado encontra-se descrito nos seguintes passos:

1. Pesaram-se 50 mg do extrato hidroalcoólico de *R. ulmifolius* e procedeu-se à sua dissolução em 10 mL de água;
2. Filtrou-se a solução obtida para retirar material residual por dissolver e adicionaram-se 400 mg de alginato de sódio;
3. Colocou-se a solução preparada numa placa de agitação a 400 rpm durante 2h de forma a garantir a dissolução completa do alginato;
4. Mediram-se 10 mL da solução utilizando uma seringa de 20 mL. Esta foi acondicionada na bomba de seringa do equipamento Nisco Var J30;
5. Fixou-se o caudal de alimentação da solução ao nozzle em 0,3 mL/min e a pressão de alimentação do azoto 0,1bar;
6. Dispensaram-se os 10 mL da solução preparada para a solução de coagulação (250 mL de solução de CaCl₂ 4% (w/v));
7. Uma vez finalizada a atomização, manteve-se a solução de coagulação sob agitação a 200 rpm e temperatura ambiente durante 4h de forma a garantir a consolidação das microesferas produzidas;

8. Filtrou-se a solução de coagulação para separar as microesferas. Seguidamente estas foram lavadas com água destilada (100 mL) e a solução obtida filtrada. Este procedimento foi repetido duas vezes;
9. Recolheram-se as microesferas obtidas e acondicionaram-se ao abrigo da luz para posterior utilização.

2.7. Caracterização das microesferas

As microesferas produzidas foram observadas por microscopia ótica (MO) utilizando um microscópio Nikon Eclipse 50i equipado com uma câmara Nikon Visão Digital e o *software NIS-Elements Documentation* para a aquisição de dados. Foram adquiridas imagens com a ampliação de 40, 100, e 400X, após a produção e a etapa de coagulação. Os dados obtidos permitiram analisar a morfologia e o tamanho das partículas produzidas, este determinado mediante o uso de uma calibração existente do microscópio que estabelece a relação entre o número de pixéis e a unidade de comprimento (micrómetros (μm)). Foi também possível com esta análise inferir a presença/ausência de princípio ativo no interior e exterior das microesferas.

A presença do extrato no interior das microesferas foi verificada por intermédio da análise por FTIR. Para o efeito foram comparados os espectros do alginato puro (material da microesfera), do extrato hidroalcoólico de *R. ulmifolius* livre e das microesferas contendo o extrato encapsulado. Foi utilizado um espectrofotómetro FTIR Bomen (modelo MB 104) em modo transmitância e utilizada a técnica da pastilha (pastilha de KBr com uma concentração de amostra de 1% (m/m)). Os espectros foram adquiridos na gama de 650 a 4000 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} adicionando 48 varrimentos.

As microesferas produzidas foram ainda caracterizadas quanto ao resíduo seco e eficiência de encapsulação (EE).

O resíduo seco foi determinado como a razão entre a massa das microesferas secas (liofilizadas) e a massa das microesferas húmidas e expressa em termos de percentagem.

A avaliação da eficiência de encapsulação (EE) foi determinada por quantificação do extrato não encapsulado. Para tal avaliou-se cumulativamente o extrato remanescente na solução de coagulação e na 1ª solução de lavagem. A quantificação foi realizada por HPLC. Dado o extrato ser uma mistura complexa formada por vários constituintes, optou-se por avaliar a presença de dois derivados do ácido elágico: Sanguin e Lambertianina (compostos maioritários do extrato).

A eficiência de encapsulação pode ser estimada utilizando a seguinte expressão:

$$\text{Eficiência de encapsulação (EE)} = \frac{Mp.a.t - Mp.a.ne}{Mp.a.t} \times 100$$

na qual, Mp.a.t corresponde à quantidade de substância teórica efetivamente encapsulada e (Mp.a.ne) corresponde a quantidade por encapsular determinada como descrito anteriormente.

2.8. Incorporação do extrato hidroalcoólico de *R. ulmifolius*, livre e em microesferas, no iogurte

A matriz alimentar escolhida foi o iogurte natural com 3,5% de matéria gorda. Foram colocados 140 g de iogurte numa tina de modo a garantir a homogeneidade da amostra. A matriz foi dividida em 6 porções para a preparação das seguintes amostras:

- 2 amostras de 25 g de iogurte simples (controlo),
- 2 amostras de 25 g de iogurte para incorporação do extrato livre (6,25 mg);
- 2 amostras de 20 g para incorporação do extrato microencapsulado (40 mg).

Foram analisados dois tempos: tempo inicial (t0), isto é o momento imediatamente após a adição do extrato e do respetivo microencapsulado, e o tempo de 3 dias (t3). Após recolha das amostras conforme o planeamento estabelecido (t=0 e t=3 dias), estas foram liofilizadas e acondicionadas para posterior análise. As amostras foram submetidas a dois ensaios químicos para determinar a atividade antioxidante nomeadamente, atividade captadora de radicais DPPH e poder redutor. Os procedimentos utilizados estão descritos no ponto 2.5.1 (atividade captadora de radicais DPPH) e no ponto 2.5.2 (poder redutor).

2.9. Análise estatística

Os ensaios relativos a cada uma das amostras foram feitos em triplicado. Os resultados foram expressos em valores médios \pm desvio padrão (DP). Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) seguida de um teste de Tukey HSD com $\alpha = 0,05$. Este tratamento foi efetuado utilizando o programa SPSS v. 18.0.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Perfil fenólico do extrato hidroalcoólico e da decocção

A análise dos compostos fenólicos foi efetuada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a deteção por díodos e espectrometria de massa (HPLC-DAD-ESI/MS). O perfil cromatográfico das amostras, evidenciado na **Figura 6**, foi registado a 280 e 370 nm na tentativa de melhor identificação e quantificação dos compostos fenólicos existentes.

O perfil fenólico do extrato hidroalcoólico e da decocção de *R. ulmifolius* foi similar, variando apenas nas concentrações encontradas para cada um dos compostos fenólicos.

A identificação foi estabelecida com base nas suas características cromatográficas e espetros de absorção (em comparação com a nossa biblioteca de dados), iões moleculares e padrão de fragmentação de MS². A **Tabela 5** apresenta a tentativa de identificação dos compostos presentes nas duas preparações, extrato hidroalcoólico e decocção, através dos espetros de massa e UV.

Foram detetados vinte e quatro compostos fenólicos diferentes nas duas preparações, nos quais sete foram identificados como ácidos fenólicos (ácido cafeoilquínico e ácido di-cafeoilquínico, *p*-coumaroilquínico, feruloilquínico e ácido elágico), onze flavonoides (derivados de quercetina e canferol, e catequina) e seis taninos hidrolisáveis (lambertianina, sanguin e di-hexa-hidroxidifenol (HHDP)-galoil glucose).

Os derivados do ácido quínico foram os principais ácidos fenólicos identificados, de acordo com os seus espetros de UV ($\lambda_{\text{máx}}$ a 314-330 nm) e iões pseudomoleculares [M-H]⁻ (m/z a 337, 353 e 367, todos eles produzindo um ião produto a m/z 191, devido ao ácido quínico desprotonado).

O pico 1, o principal ácido fenólico encontrado, e o pico 2 foram identificados como ácidos 3-*O*-cafeoilquínico e 3-*p*-cumaroilquínico, respetivamente, uma vez que pico 1 originou ácido quínico desprotonado (m/z a 191) como pico base e outro ião maioritário correspondente ao resíduo de ácido hidroxicinâmico a m/z 179 [ácido caféico-H]⁻, e o pico 2 apresentou m/z 163 [ácido *p*-cumárico-H]⁻ como pico base, um

padrão de fragmentação característico dos ácidos 3-acilclorogénicos (Clifford et al., 2003; Clifford et al., 2005).

Do mesmo modo, o pico 3, com um ião maioritário a m/z 193 [ácido *p*-ferúlico-H]⁻, foi identificado como ácido 3-*O*-feruloilquínico tendo em conta o seu ião pseudomolecular e padrão de fragmentação.

O pico 19 ([M-H]⁻ com m/z 515) foi identificado como ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico com base na sua ordem de eluição e padrão de fragmentação (Clifford et al., 2003; Clifford et al., 2005).

O pico base MS² foi a m/z 353, produzido pela perda de uma unidade de cafeoil [M-H-cafeoil]⁻, e subsequente fragmentação deste ião produzindo os mesmos fragmentos que o ácido 5-cafeoilquínico a m/z 191, 179 e 135, embora, neste caso, com um sinal comparativamente mais intenso a m/z 179 [ácido caféico-H]⁻ (~ 60% de pico base).

O pico 4 apresentou um espectro UV semelhante ao do ácido *p*-cumárico, com $\lambda_{\text{máx}}$ a rondar os 313 nm; a área do pico é muito pequena, conduzindo a um ião pseudomolecular inexistente, mas libertou um fragmento a m/z 163 correspondendo a um [ácido cumárico-H]⁻. A partir do espectro UV e fragmentação, o composto foi identificado como um derivado *p*-coumaroilo.

O pico 18 corresponde a um ácido elágico e foi positivamente identificado de acordo com as suas características de retenção, de massa e UV-vis, por comparação com o padrão comercial; este pico foi detetado, apenas, na decocção.

Foram encontrados principalmente derivados de flavonóis (**Tabela 5**); catequina (pico 5), quercetina 3-*O*-rutinósido (pico 13), quercetina 3-*O*-glucósido (pico 15), canferol 3-*O*-rutinósido (pico 20) e canferol 3-*O*-glucósido (pico 23) foram positivamente identificados de acordo com as suas características de retenção, massa e de UV-vis por comparação com padrões comerciais.

Os picos 14-16 apresentaram um espectro UV com $\lambda_{\text{máx}}$ a rondar os 350 nm, e um fragmento a m/z 301 [quercetina-H]⁻ correspondendo a derivados da quercetina.

Os compostos apresentaram iões pseudomoleculares [M-H]⁻ a m/z 477 e 463, respetivamente, e libertaram um fragmento MS² a m/z 301 ([M-H-176]⁻ e [M-H-162]⁻ correspondentes a perda das unidades glucoronilo e hexosilo, respetivamente); estes compostos foram identificados como quercetina 3-*O*-glucurónido (pico 14), por

comparação com um padrão isolado no nosso laboratório (Dueñas et al., 2008), e quercetina 3-*O*-hexósido (pico 16).

O mesmo padrão de fragmentação foi também encontrado para o canferol (picos 21 e 22). Os picos 17 e 24 ($[M-H]^-$ a m/z 579 e 489, respetivamente) correspondem a canferol *O*-pentosilo hexósido e canferol *O*-acetil-hexósido de acordo com os seus íões pseudomoleculares e fragmentos MS^2 libertados a m/z 285 (quercetina, $[M-H-132-162]^-$, perda de uma unidade pentosil-hexósido e $[M-H-42-162]^-$, perda de uma unidade acetil-hexósido, respetivamente).

Os compostos seguintes foram identificados como taninos hidrolisáveis apresentando um espectro UV coerente com derivados galoilo e hexa-hidroxi-difenol (HHDP) e com outros compostos, como derivados da lambertianina e sanguinóis os quais foram identificados utilizando a literatura (Gasperotti et al. 2010, González-Bairro et al., 2010). Este tipo de compostos tem sido descrito em vários frutos do género *Rubus*.

Os picos 9, 10 e 11 apresentaram um íão pseudomolecular a m/z 935 e foram identificados como isómeros de glucose di-HHDP-galoilo. O seu padrão de fragmentação envolveu a perda de porções hexa-hidroxi-difenóilo e galoil glucósido (m/z 633 e 301, respetivamente).

O fragmento a m/z 301, para além do íão $[M-H-302]^-$, representou uma evidência da presença de um grupo HHDP [elágico-H] na molécula.

Os picos 6 e 8 apresentaram um íão pseudomolecular a m/z 1567 (m/z 783 duplamente carregado); MS^2 produziu uma sequência de fragmentos iónicos singularmente carregados a m/z 633 e 301, que foram atribuídos à perda sequencial de unidades elágicas (monómero característico das espécies do género *Rubus*) e di-HHDP galoil glucósido (936 Da).

De acordo com o espectro MS e com Gasperotti et al. (2010) e González-Barrio et al. (2010), estes picos foram atribuídos a isómeros de sanguinol H-10.

Da mesma forma, o pico 7 foi identificado com base na fragmentação MS, mas também com o apoio da literatura (Gasperotti et al., 2010 e González-Barrio et al., 2010), como lambertianina C. Este pico apresentou um íão pseudomolecular a m/z 1401, o qual estava duplamente carregado, dando uma massa molecular exata de 2804.

A fragmentação resultou num íão molecular a m/z 1235 (1567-169-162, perda de glucose galoilada) e os restantes fragmentos a m/z 935 (di-HHDP galoil glucósido),

m/z 633 e m/z 301 que correspondem à perda sequencial de unidades elágicas. Os picos 7 e 8 são relativos aos compostos mais abundantes encontrados em *R. ulmifolius*.

O perfil fenólico de ambas as preparações foi idêntico, variando principalmente nas concentrações encontradas (**Tabela 5**). O extrato hidroalcoólico apresentou maior concentração de compostos fenólicos totais (240,48 mg/g extrato) do que a decocção, principalmente devido à maior concentração de taninos hidrolisáveis (203,39 mg/g extrato). Os compostos mais abundantes encontrados em ambas as preparações foram derivados elagitaninos nomeadamente, um isómero de sanguiin H-10 e a lambertianina. Gasperotti et al., (2010) e González-Barrio et al., (2010) também identificaram estes compostos em frutos de *Rubus fruticosus* e *Rubus idaeus*.

De facto, os frutos das espécies do género *Rubus* têm sido amplamente estudados e são conhecidos por conter pequenas quantidades de flavonoides nomeadamente, conjugados de quercetina e canferol baseados em flavonol, sendo os componentes principais, a quercetina 3-*O*-glucurónido e a quercetina 3-*O*-glucósido, bem como níveis vestigiais de ácido elágico e conjugados de ácido elágico com açúcar (Zafrilla et al., 2001). Estes últimos compostos foram também encontrados nas flores de *R. ulmifolius* aqui estudadas, mas como compostos principais, assim como a quercetina-3-*O*-glucurónido e a quercetina 3-*O*-glucósido que foram os flavonóis presentes mais abundantes.

O ácido elágico tem sido referenciado como tendo atividade antiviral e fornecendo proteção contra cancro do cólon, pulmão e esófago; por exemplo, os benefícios para a saúde do consumo de framboesa têm sido promovidos com base em alegações de um alto conteúdo de ácido elágico (González-Barrio et al., 2010).

Pelo que é do nosso conhecimento, esta é a primeira vez que estes compostos foram identificados e quantificados em botões florais de *R. ulmifolius*.

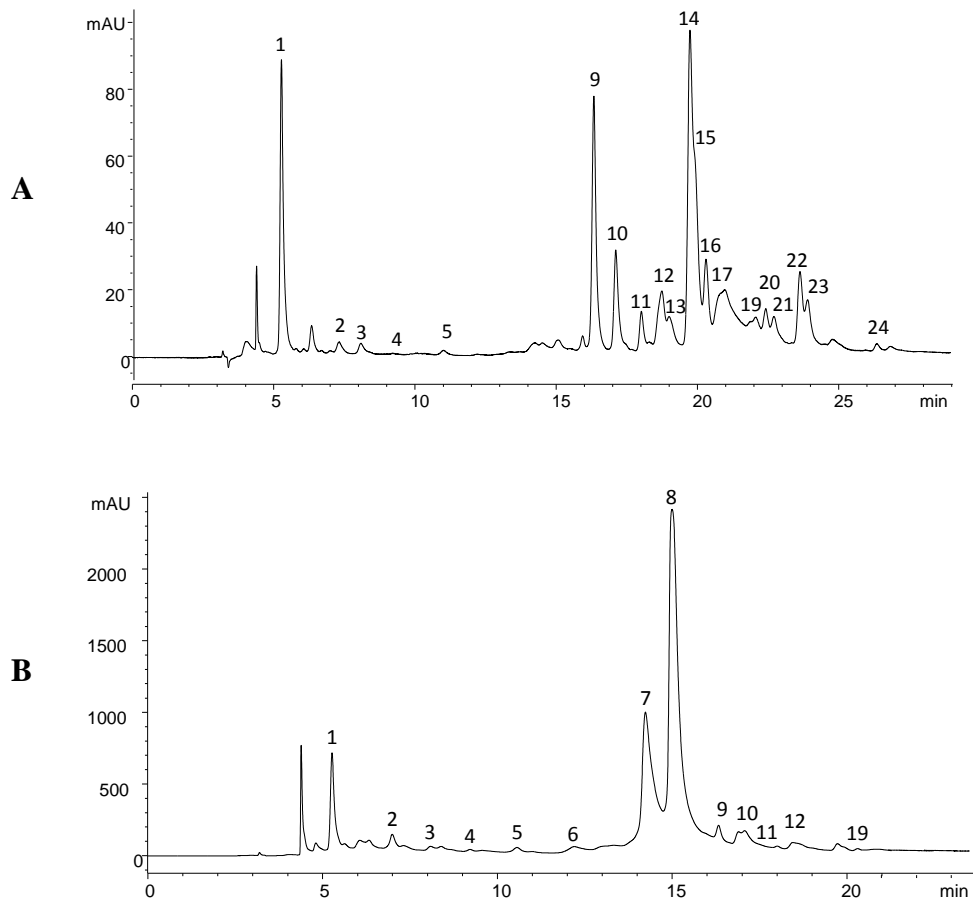


Figura 6. Perfil fenólico, obtido por HPLC, do extrato hidroalcoólico de *Rubus ulmifolius*, registado a 370 nm (A) e 280 nm (B) para os flavonoides e ácidos fenólicos, respetivamente.

Tabela 5. Tempos de retenção (Rt), comprimentos de onda de absorção máxima na região do visível ($\lambda_{\text{máx}}$), dados do espectro de massa, identificação e quantificação de compostos fenólicos de *Rubus ulmifolius*.

Pico	Rt (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Ião Molecular [M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Tentativa identificação	Hidroalcoólico	Decocção
1	5,2	326	353	191(100),179(67),173(6),135(55)	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	17,83 ± 0,55	13,69 ± 0,63
2	6,9	310	337	191(18),173(6),163(100),119(53)	Ácido 3- <i>p</i> -cumaroilquínico	1,45 ± 0,00	1,18 ± 0,12
3	8,0	326	367	193(100),191(5),173(9),134(35)	Ácido 3- <i>O</i> -feruloilquínico	0,82 ± 0,04	0,62 ± 0,02
4	9,1	313	-	163(8),119(100)	Derivados <i>p</i> -cumaroil	0,14 ± 0,00	0,70 ± 0,03
5	10,5	278	289	245(93),203(72),137(42)	Catequina	2,83 ± 0,10	2,29 ± 0,37
6	12,1	278	1567	1265(5),1235(4),1103(5),935(27),783(37),633(100),301(11)	Isómero Sanguiin H-10	2,44 ± 0,08	14,43 ± 1,19
7	14,1	280	1401 ^a	1265(5),933(11),633(20),301(10)	Lambertianina C	56,73 ± 0,89	25,67 ± 2,69
8	14,9	280	1567	1265(5),1235(12),1103(4),935(100),783(10),633(86),301(4)	Isómero Sanguiin H-10	133,44 ± 2,64	83,81 ± 1,10
9	16,3	256/356	935	633(21), 301(51)	Isómero Galoil-bis-HHDP- glucose	4,50 ± 0,04	5,46 ± 0,05
10	17,1	256/354	935	633(8),301(24)	Isómero Galoil-bis-HHDP- glucose	4,28 ± 0,04	4,49 ± 0,02
11	17,9	256/354	935	633(12),301(14)	Isómero Galoil-bis-HHDP- glucose	0,56 ± 0,07	0,37 ± 0,06
12	18,6	256/354	935	633(11),301(15)	Isómero Galoil-bis-HHDP- glucose	1,43 ± 0,10	3,63 ± 0,20
13	18,9	354	609	301(100)	Quercetina 3- <i>O</i> -rutinósido	0,48 ± 0,03	0,48 ± 0,05
14	19,6	354	477	301(100)	Quercetina 3- <i>O</i> -glucurónido	4,52 ± 0,12	4,33 ± 0,10
15	19,9	354	463	301(100)	Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido	2,54 ± 0,03	2,05 ± 0,27
16	20,2	348	463	301(100)	Quercetina <i>O</i> -hexósido	1,34 ± 0,08	nd
17	20,9	348	579	285(100)	Canferol <i>O</i> -pentosil-hexósido	1,15 ± 0,11	1,11 ± 0,05
18	21,0	251/363	301	284(5),229(6),185(3)	Ácido elágico	nd	5,69 ± 0,28
19	21,9	328	515	353(100),191(90),179(60),173(2),135(27)	Ácido 3,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico	1,04 ± 0,04	1,34 ± 0,16
20	22,3	354	593	285(100)	Canferol 3- <i>O</i> -rutinósido	0,62 ± 0,11	0,76 ± 0,03
21	22,6	350	447	285(100)	Canferol <i>O</i> -hexósido	0,51 ± 0,06	0,49 ± 0,01
22	23,5	347	461	285 (100)	Canferol <i>O</i> -glucurónido	0,99 ± 0,07	1,03 ± 0,06
23	23,8	347	447	285(100)	Canferol-3- <i>O</i> -glucósido	0,71 ± 0,01	0,74 ± 0,06
24	26,3	354	489	285(100)	Canferol acil-hexósido	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01
Total Ácidos Fenólicos						21,28 ± 0,59	23,21 ± 0,96
Total Taninos Hidrolisáveis						203,39 ± 3,23	137,85 ± 2,59
Total Flavonoides						14,45 ± 0,44	13,38 ± 0,05
Total Compostos Fenólicos						240,48 ± 3,17	174,44 ± 3,50

^a[M-H]²⁻. Em cada linha, letras diferentes correspondem a diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

3.2. Propriedades antioxidantes *in vitro*

As plantas, tal como outras amostras de origem natural, são constituídas por uma ampla diversidade química de compostos antioxidantes.

Portanto, neste trabalho as propriedades antioxidantes foram avaliadas usando um extrato hidroalcoólico e uma decocção obtidos a partir das flores de *R. ulmifolius*.

Atualmente são vários os testes existentes para avaliar a capacidade antioxidante. Contudo, não existe um método universal capaz de avaliar com precisão a capacidade antioxidante de todas as amostras quantitativamente (Niki, 2010). Neste trabalho, as propriedades antioxidantes foram avaliadas através de ensaios químicos: atividade captadora de radicais DPPH e poder redutor; e bioquímicos: inibição da peroxidação lipídica no sistema β -caroteno/linoleato e na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico e da decocção de *R. ulmifolius* apresentam-se na **Tabela 6**. O extrato hidroalcoólico revelou maior atividade antioxidante (valores de EC_{50} inferiores) em todos os ensaios *in vitro* (valores de EC_{50} entre 1,58 e 34,23 $\mu\text{g/mL}$) do que a decocção (valores de EC_{50} entre 184,21 e 201,72 $\mu\text{g/mL}$).

Estes resultados estão de acordo com a concentração superior de compostos fenólicos (240,48 mg/g), encontrada no extrato hidroalcoólico em comparação com a decocção (177,44 mg/g).

Um extrato metanólico estudado anteriormente pelo nosso grupo de investigação (Barros et al., 2010) apresentou valores de EC_{50} ligeiramente superiores ($\leq 40 \mu\text{g/mL}$) e, portanto, menor atividade antioxidante. Existem vários estudos que descrevem a atividade antioxidante de frutos de espécies do género *Rubus* e um, em particular, que estudou a atividade antioxidante de folhas de *R. ulmifolius* usando o ensaio da descoloração do radical (ABTS). No entanto, pelo que sabemos, não há publicações disponíveis sobre a decocção da parte da planta aqui estudada ou do seu extrato hidroalcoólico.

Tabela 6. Atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico e da decocção de *Rubus ulmifolius* (média \pm DP).

Atividade antioxidante	Hidroalcoólico	Decocção
Atividade captadora de radicais DPPH (EC ₅₀ , $\mu\text{g/mL}$)	34,23 \pm 2,75 ^a	184,21 \pm 21,40 ^b
Poder redutor (EC ₅₀ , $\mu\text{g/mL}$)	29,27 \pm 0,80 ^a	191,23 \pm 0,58 ^b
Inibição da descoloração do β -caroteno (EC ₅₀ , $\mu\text{g/mL}$)	3,90 \pm 0,46 ^a	197,04 \pm 4,81 ^b
Inibição de TBARS (EC ₅₀ , $\mu\text{g/mL}$)	1,58 \pm 0,07 ^a	201,72 \pm 3,67 ^b

Em cada linha, letras diferentes correspondem a diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

3.3. Produção de microesferas de alginato contendo o extrato hidroalcoólico de *R. ulmifolius*

Após testes iniciais realizados à escala de 50 mg de extrato para 400 mg de alginato (razão extrato/alginato de 0,125, m/m), produziu-se um *batch* de microesferas contendo o extrato de *R. ulmifolius* para posterior incorporação no iogurte. Para tal foram utilizados 100 mg de extrato e 800 mg de alginato dissolvidos em 20 mL de água destilada, tendo sido atomizados 14 mL. Após o processo de separação e lavagem obtiveram-se 4,825 g de microesferas hidratadas. Uma vez submetidas à liofilização obtiveram-se 0,295 g de microesferas secas o que conduziu à obtenção de um resíduo seco de 6,1%. O estudo mais completo pode ser consultado no **Anexo A**.

As microesferas produzidas foram observadas por MO imediatamente após a finalização da atomização e decorridas 4h em contacto com a solução de coagulação (**Figura 7**). Esta análise permitiu confirmar que o processo decorreu com sucesso. As microesferas apresentaram uma morfologia esférica e individualizada (não se detetaram aglomerados), sendo este facto válido para a análise após atomização e após consolidação. O tamanho das microesferas produzidas variou entre 79 μm a 380 μm . Foi também possível observar que o extrato ficou bem distribuído nas microesferas produzidas (as microesferas apresentavam a cor rosada homogénea característica do extrato).

A análise por HPLC com vista à quantificação dos derivados do ácido elágico (Sanguiniin e Lambertianina) revelou que estes estavam presentes em concentrações residuais (abaixo do limite de deteção) ou ausentes, respetivamente para a solução de coagulação e 1ª solução de lavagem. Tal permitiu estimar uma eficiência de encapsulação próxima dos 100%.

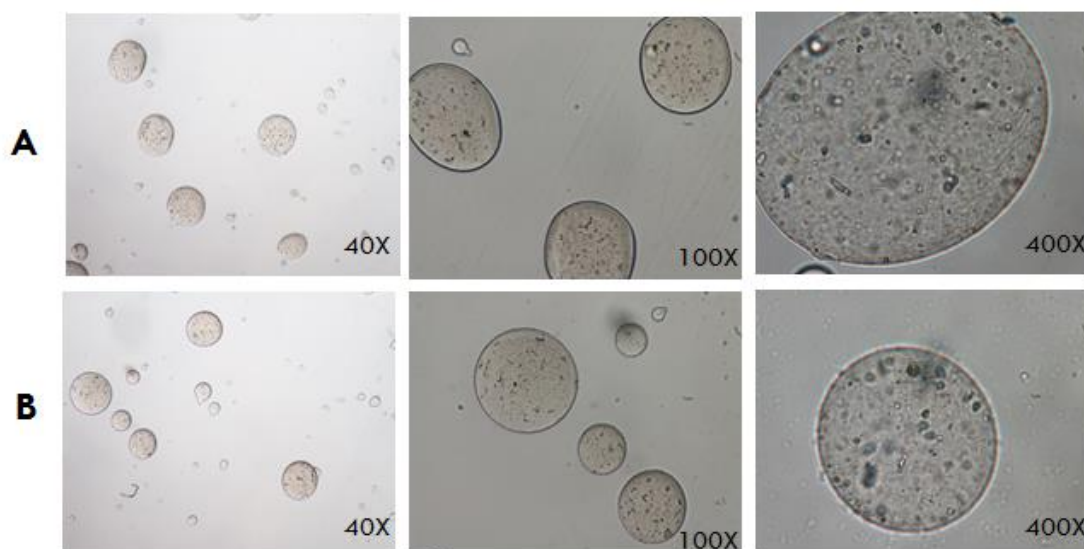


Figura 7. A- Observação das microsferas após atomização; B- Observação das microsferas após a coagulação.

3.4. Reidratação das microsferas após a liofilização

As microsferas secas, resultantes do processo de liofilização, foram reidratadas em água destilada, por um período de 24h, de forma a testar a capacidade de recuperação da sua morfologia inicial. Este é um parâmetro importante tendo em vista a sua armazenagem sob a forma liofilizada, que comparativamente com a forma hidratada minimiza a degradação dos compostos presentes no extrato (melhora a manutenção da bioatividade). Uma vez incorporadas no iogurte, ou outra matriz alimentar, é importante que estas recuperem a sua forma por reidratação.

Na **Figura 8**, apresenta-se o registo fotográfico das microsferas secas e reidratadas a uma ampliação de 40, 100, e 400x. A massa de microsferas secas utilizada foi de 0,0547 g. Para as condições aplicadas verificou-se um aumento do tamanho das microsferas testadas ao longo do tempo tendo-se atingido uma massa final de 0,7037g ao fim de 24 horas (cerca de 80% da massa prevista para as microsferas

hidratadas). Por análise das imagens obtidas por MO verifica-se o tamanho final das microesferas aproximou-se do tamanho estimado para as microesferas antes do processo de liofilização comprovando a sua boa capacidade de reidratação.

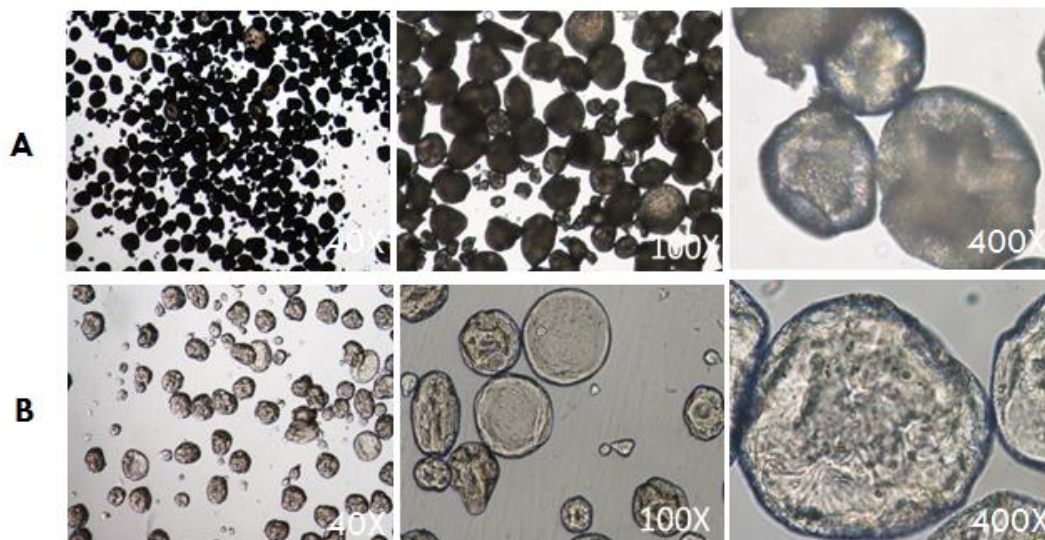


Figura 8. A-Observação das microsferas secas; B- Observação das microsferas hidratadas.

3.5. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros de absorção no infravermelho (IV) estão representados na **Figura 9** (análise do alginato puro, do extrato isolado e das microesferas liofilizadas contendo o extrato). Como previsto, o espectro das microesferas é dominado pela presença do alginato uma vez que se utilizou uma razão extrato/alginato de 100/800 (m/m) (ver principais contribuições assinaladas com traço azul a tracejado). No entanto é possível notar no espectro das microesferas a contribuição das vibrações dos carbonilos (C=O) e dos grupos hidroxilo (OH) do extrato (assinalado com traço vermelho a tracejado). O alargamento das bandas dos OHs e C=Os do espectro das microesferas devido às bandas do extrato anteriormente focadas constituem uma evidência de que as microesferas contêm o extrato encapsulado.

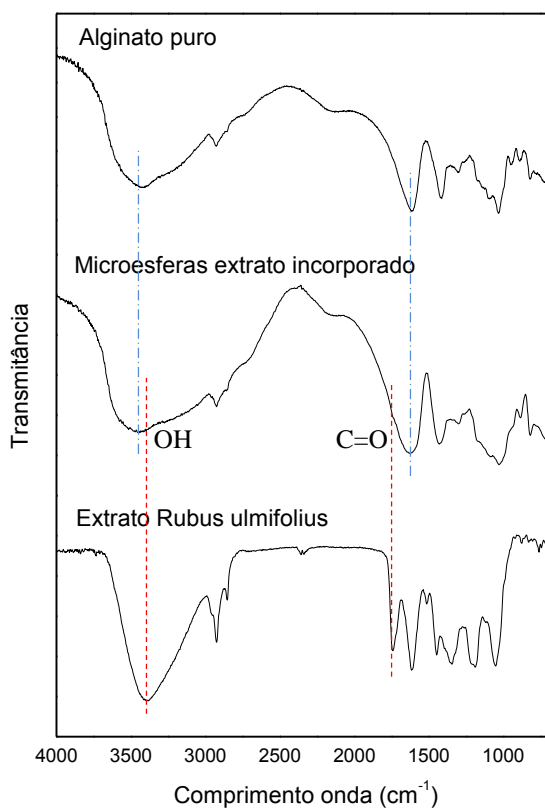


Figura 9. Espectro do alginato, do extrato hidroalcoólico e das microesferas contendo o extrato hidroalcoólico de *R. ulmifolius*.

3.6. Incorporação do extrato hidroalcoólico de *R. ulmifolius*, livre e em microesferas, no iogurte

A **Tabela 7** mostra os resultados obtidos para a atividade antioxidante avaliada de acordo com dois parâmetros: atividade captadora de radicais DPPH e poder redutor.

Ambas as formas (extrato livre e microencapsulado) mostraram maior atividade captadora de radicais DPPH que o controlo (valores de EC₅₀ mais baixos) e, na maioria, também maior poder redutor. Os resultados obtidos mostraram também que as formas referidas (extrato livre e microencapsulado) originaram produtos com melhor preservação da atividade antioxidante ao longo do tempo (em ambos os ensaios, os valores de EC₅₀ diminuíram do tempo 0 para o tempo 3 dias). Em síntese, os resultados obtidos demonstraram o potencial antioxidante do extrato hidroalcoólico de *R. ulmifolius* e a eficiência da microencapsulação para a sua preservação.

Tabela 7. Atividade antioxidante do iogurte enriquecido com extrato hidroalcoólico de *Rubus ulmifolius*, livre e microencapsulado (média ± DP).

	Controlo iogurte		Iogurte com extrato livre		Iogurte com extrato microencapsulado	
	0 dias	3 dias	0 dias	3 dias	0 dias	3 dias
Atividade captadora de radicais DPPH (EC ₅₀ , mg/mL)	91,19 ± 1,24	146,17 ± 5,16	49,34 ± 0,49	49,88 ± 2,31	90,71 ± 3,84	84,15 ± 1,71
Poder redutor (EC ₅₀ , mg/mL)	2,86 ± 0,01	13,52 ± 0,66	16,34 ± 0,07	2,11 ± 0,12	15,68 ± 0,08	5,64 ± 0,10

Na **Figura 10** apresenta-se o registo fotográfico das microesferas incorporadas no iogurte no tempo inicial (t0), isto é o momento imediatamente após a adição do extrato microencapsulado, e após 3 dias (t3) a uma ampliação de 40, 100, e 400x. Da observação das imagens para o tempo t3 verifica-se que as microesferas mantêm a sua morfologia inicial não se tendo desagregado. Este facto aponta para um papel protetor efetivo da matriz de alginato.

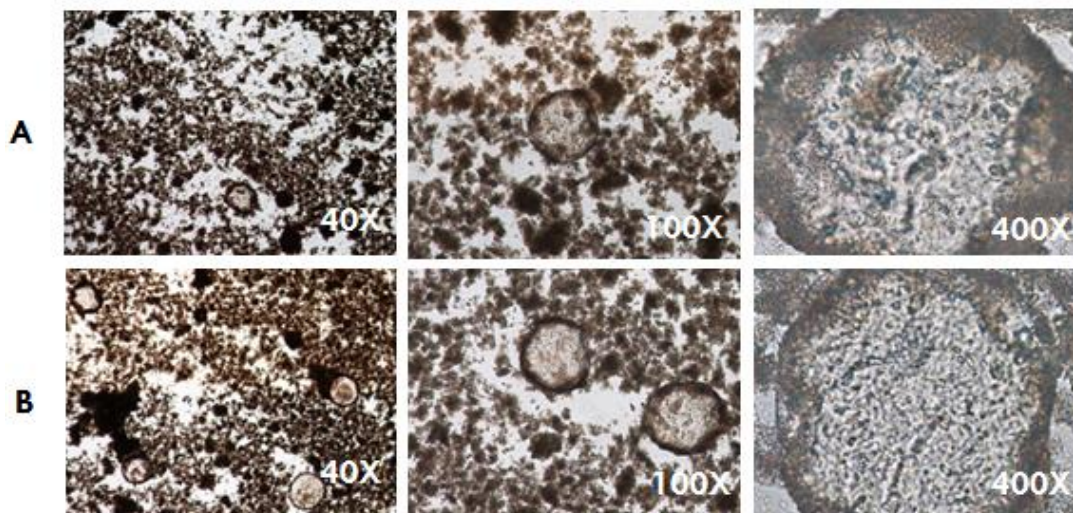


Figura 10. A-Observação das microsferas incorporadas no iogurte no tempo inicial (t_0);
B- Observação das microsferas incorporadas no iogurte após três dias (t_3).

IV. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS DE TRABALHO FUTURO

Este trabalho teve como objetivo, numa primeira fase, avaliar a atividade antioxidante e efetuar a caracterização química dos compostos fenólicos obtidos por extração hidroalcoólica e decocção de botões florais de *Rubus ulmifolius* Schott (Rosaceae). Numa segunda fase efetuou-se a microencapsulação do extrato hidroalcoólico na sua forma liofilizada utilizando como material de encapsulação o alginato. Perspetivando a utilização destes extratos na área alimentar efetuou-se, numa terceira fase, um teste de incorporação num iogurte natural com avaliação da atividade antioxidante imediatamente após a adição (t=0) e após 3 dias (t=3). A atividade antioxidante do iogurte aditivado com o extrato microencapsulado foi comparada com a do iogurte puro (controlo) e com a do iogurte aditivado com uma quantidade equivalente de extrato livre.

No que respeita à caracterização química foram identificados vários compostos fenólicos, maioritariamente derivados de elagitaninos nomeadamente, os isómeros sanguin H-10 e lambertianina. Mais concretamente foram detetados vinte e quatro compostos fenólicos diferentes nas duas preparações (extrato hidroalcoólico e decocção), nos quais sete foram identificados como ácidos fenólicos (ácido cafeoilquínico e ácido di-cafeoilquínico, p-coumaroilquínico, feruloilquínico e ácido elágico), onze flavonoides (derivados de quercetina e canferol, e catequina) e seis taninos hidrolisáveis (lambertianina, sanguin e di-hexa-hidroxidifenol (HHDP)-galoil glucose). Não obstante o perfil fenólico do extrato hidroalcoólico e da decocção de *R. ulmifolius* ser qualitativamente idêntico, a concentração em compostos fenólicos foi superior no extrato hidroalcoólico tendo resultado numa atividade antioxidante também superior.

A técnica de atomização/coagulação foi a escolhida para a produção das microesferas de alginato. A formulação otimizada utilizou 100 mg de extrato hidroalcoólico liofilizado para 800 mg de alginato (razão extrato/alginato de 0,125, m/m) tendo-se obtido microesferas com um tamanho estimado entre 79 µm a 380 µm. O resíduo sólido das microesferas hidratadas obtidas no final do processo foi determinado como sendo 6,1% e a eficiência de encapsulação, estimada com base derivados do ácido elágico (Sanguin e Lambertianina), próxima de 100%.

As microesferas liofilizadas foram testadas quanto à sua capacidade de reidratação tendo-se verificado que ao fim de 24 horas tinham recuperado cerca de 80% da massa prevista para as microesferas hidratadas.

O extrato fenólico (na forma livre e microencapsulado) foi incorporado num iogurte natural visando alcançar benefícios antioxidantes. Ambas as formas (extrato livre e microencapsulado) mostraram maior atividade captadora de radicais DPPH que o controlo (valores de EC_{50} mais baixos) e, na maioria, também maior poder redutor. Os resultados obtidos mostraram também que as formas referidas (extrato livre e microencapsulado) originaram produtos com melhor preservação da atividade antioxidante ao longo do tempo (em ambos os ensaios, os valores de EC_{50} diminuíram do tempo 0 para o tempo 3 dias).

Em síntese, os resultados obtidos demonstraram o potencial antioxidante do extrato hidroalcoólico de *R. ulmifolius* e a eficiência da microencapsulação para a sua preservação.

Como trabalho futuro, será interessante proceder à avaliação do efeito do pH na atividade antioxidante do iogurte aditivado com o extrato microencapsulado e livre como forma de simular o pH do estômago (pH ácido) e do intestino (pH básico). Com a microencapsulação pretende-se que os compostos fenólicos sejam preservados durante o tempo de prateleira do iogurte maximizando a sua biodisponibilidade quando ingeridos.

A obtenção dos perfis de libertação dos compostos fenólicos para vários valores de pH é também um tema de interesse para trabalho futuro. Neste caso, e dado o extrato ser uma mistura de diversos compostos fenólicos, sugere-se a realização deste estudo para os compostos maioritários.

V. BIBLIOGRAFIA

- Acqua, S.D., Cervellati, R., Loi, M.C., Innocenti, G. (2008). Evaluation of in vitro antioxidant properties of some traditional Sardinian medicinal plants: Investigation of the high antioxidant capacity of *Rubus ulmifolius*. *Food Chemistry*, 106, 745-749.
- Anson, R. (2005). Microencapsulation: For enhanced textile performance. *Performance Apparel Markets*, 12, 21-39.
- Azeredo, H.M.C. (2005). Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alimento e Nutrição*, 16, 89-95.
- Bansode, S.S., Banarjee, S.K., Gaikwad, D.D., Jadhav, S.L., Thorat, R.M. (2010). Microencapsulation: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 1, 38-43.
- Barbaste, M., Berke, B., Dumas, M., Soulet, S., Delaunay, J.C., Castagnino, C. (2002). Dietary antioxidants, peroxidation and cardiovascular risks. *Journal of Nutritional Health and Aging*, 6, 209-223.
- Barros, L., Oliveira, S., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. (2010). In vitro antioxidant properties and characterization in nutrients and phytochemicals of six medicinal plants from the Portuguese folk medicine. *Industrial Crops and Products*, 32, 572-579.
- Belščak-Cvitanović, A., Stojanović, R., Manojlović, V., Komes, D., Cindrić, I.J., Nedović, V., Bugarski, B. (2011). Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Research International* 44, 1094-1101.

- Camejo-Rodrigues, J., Ascensão, L., Bonet, M.À., Vallès, J. (2003). An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of Serra de S. Mamede (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 199-209.
- Çam, M., İċyer, N.C., Erdogan, F. (2013). Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT - Food Science and Technology*, 1-7.
- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- Carvalho, A.M. (2010). Plantas y sabiduría popular del Parque Natural de Montesinho. Un estudio etnobotánico en Portugal. *Biblioteca de Ciencias*, 35. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Chan, E., Yim, Z., Phan, S., Mansa, R.F., Ravindra, P. (2010). Encapsulation of herbal aqueous extract through absorption with ca-alginate hydrogel beads. *Food and Bioproducts Processing*, 88, 195-201.
- Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S., Kuhnert, N.A. (2003). A hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2900-2911.
- Clifford, M.N., Knight, S., Kuhnert, N.A. (2005). Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3821-3832.
- Costa, C., Teixeira, D. (2007). Medicamentos e plantas. Universidade de Évora, Departamento de Química.
- Cunha, A.P. (2005). Farmacognosia e Fitoquímica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

- Cunha, A.P., Teixeira, F., Silva, A.P., Roque, O.R. (2010). Plantas na Terapêutica, Farmacologia e Ensaio Clínicos, 2.º Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian.
- Czepas, J.K. (2012). Trifolium species-derived substances and extracts- Biological activity and prospects for medicinal applications. Journal of Ethnopharmacology, 143, 14-23.
- Deladino, L., Anbinder, P. S., Navarro, A. S., Martino, M.N. (2008). Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. Carbohydrate Polymers, 71, 126-134.
- Dueñas, M., Chornet, H.M., Pérez-Alonso, J.J., Paola-Naranjo, R.D., González-Paramás, A.M., Santos-Buelga, C. (2008). Preparation of quercetin glucuronides and characterization by HPLC–DAD–ESI/MS. European Food Research and Technology, 227, 1069-1076.
- Ersus, S., Yurdagel, U. (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. Journal of Food Engineering, 80, 805-812.
- Ezhilarasi, P.N., Indrani, D., Jena, B.S., Anandharamakrishnan, C. (2013). Freeze drying technique for microencapsulation of Garcinia fruit extract and its effect on bread quality. Journal of Food Engineering, 117, 513-520.
- Fang, Z., Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols- a review. Food Science & Technology, 21, 510-523.
- Fernandes, I., Amaral, J., Pinto, V., Ferreira, M., Barreiro, M.F. (2011). Chitosan microparticles loaded with essential oils having in view leather applications. In 11th International Chemical and Biological Engineering Conference, pp.552-553.
- Fernandes, L.P., Candido, R.C., Oliveira, W.P. (2012). Spray drying microencapsulation of *Lippia sidoides* extracts in carbohydrate blends. Food and bioproducts processing, 90, 425-432.

- Ferreira, I.C.F.R., Abreu, R.M.V. (2007). Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. Bioanálise - Sociedade Portuguesa de Bioanalistas da Saúde, Ano IV, n.º 2, Julho/Dezembro.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Abreu, R.M.V. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. Current Medicinal Chemistry, 16, 1543-1560.
- Flora-on (2013). <http://www.flora-on.pt/#/71VjH> , último acesso em Fevereiro de 2013.
- Foglio, M.A., Queiroga, C.L., Sousa, I.M.O., Rodrigues, R.A.F. (2006). Plantas Medicinas como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. MultiCiência: Construindo a História dos Produtos Naturais, 7.
- Gallegos-Infante, J.A., Rocha-Guzmán, N.E., González-Laredo, R.F., Medina-Torres, L., Gomez-Aldapa, C.A, Ochoa-Martínez, L.A., Martínez-Sánchez, C.E., Hernández-Santos, B., Rodríguez-Ramírez, J. (2013). Physicochemical properties and antioxidant capacity of oak (*Quercus resinosa*) leaf infusions encapsulated by spray-drying. Food Bioscience, 2, 31-38.
- Gasperotti, M., Masuero, D., Vrhovsek, U., Guella, G., Mattivi, F. (2010). Profiling and accurate quantification of rubus ellagitannins and ellagic acid conjugates using direct UPLC-Q-TOF HDMS and HPLC-DAD analysis. J. Agric. Food Chem., 58, 4602-4616.
- Goetz, M.E., Luch, A. (2008). Reactive species: A cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. Cancer Letters, 266, 73-83.
- Gomes, E.T. (2005). Etnobotânica e Etnofarmacologia. In: Cunha, A.P. da etal. Farmacognosia e Fitoquímica. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, pp. 54-55.

- González-Barrio, R., Borges, G., Mullen, W., Crozier, A. (2010). Bioavailability of anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with an ileostomy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3933-3939.
- González, J.A., García-Barriuso, M., Amich, F. (2010). Ethnobotanical study of medicinal plants traditionally used in the Arribesdel Duero, western Spain. *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 343-355.
- Hassimotto, N.M.A., Genovese, M.I., Lajolo, F.M. (2009). Antioxidant capacity of Brazilian fruit, vegetables and commercially-frozen fruit pulps. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 394-396.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Justesen, U., Knuthsen, P. (2001). Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry*, 73, 245-250.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, 89, 217-233.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. (2012). Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray-drying. *Chemical engineering research and design*, 90, 622-632.
- Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progresses in Lipid Research*, 46, 244-282.

- Liu, R.H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 517-520.
- Llamas, F., Acedo, C. (2002). Lo que VD. Debe Saber Sobre: Plantas Útiles. Caja España, Imprenta Rubín, S.L. – LEON.
- Loziene, K., Venskutonis, P.R., Sipailiene, A., Labokas, J. (2007). Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chemistry*, 103, 546-559.
- Maciel, M. A. M., Pinto, A. C., Veiga, V. F., Grynberg, N. F., Echevarria, A. (2002). Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, 25, 429-438.
- Mantle, D., Eddeb, F., Pickering, A.T. (2000). Comparison of relative antioxidantactivities of British medicinal plant species *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 47-51.
- Monasterio-Huelin, E. *Rubus* L. in Castroviejo, S. (coord. Gen.). (2001). S. Flora Iberica. Vol VI, Rosaceae.
- Montanher, A.B.P., Pizzolatti, M.G., Brighente, M.C. (2002). An application of thebrine shrimp bioassay for general screening of brazilian medicinal plants. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, 21, 175-178.
- Muñoz Rodríguez, A., Devesa Alcaráz, J. Talavera Lozano, S. *Trifolium* L. in Castroviejo, S. (coord. Gen.) S. (2001). Flora Ibérica. Vol VII, Leguminosae.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1806-1815.

- Neves, J.M., Matos, C., Moutinho, C., Queiroz, G., Gomes, L.R. (2009). Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 270-283.
- Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radicals, Biology & Medicine*, 49, 503-515.
- Nori, M.P., Favaro-Trindade, C.S., Alencar, S.M., Thomazini, M., Balieiro, J.C.C., Castillo, C.J.C. (2011). Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. *LWT- Food Science and Technology*, 44, 429-435.
- Novais, M.H., Santos, I., Mendes, S., Pinto-Gomes, C. (2004). Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrábida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 183-195
- Pinto, J.F. (2010). *Nutracêuticos e alimentos funcionais*. Lidel – edições técnicas, Lda. Lisboa – Porto.
- Pinto, L. (2005). *Síntese e estudo de Derivados do quitosano com Potencial Interesse Biológico e Ambiental*. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Departamento de química, Porto.
- Prosky, L. (2001). *Advanced dietary fibre technology*. Londres, Blackwell Science, pp.63-76.
- Roberfroid, M. (2002). Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease*, 34, 105-110.
- Romo-Hualde, A., Yetano-Cunchillos, A. I., González-Ferrero, C., Sáiz-Abajo, M. J., González-Navarro, C. J. (2012). Supercritical fluid extraction and microencapsulation of bioactive compounds from red pepper (*Capsicum annum* L.) by-products. *Food Chemistry*, 133, 1045-1049.

- Saénz, C., Tapia, S., Chávez, J., Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114, 616-622.
- Schrooyen, P. M.M., Meer, R.V. (2001). Microencapsulation: its application in nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society*, 60, 475-479.
- Silva, C., Ribeiro, A., Ferreira, D., Veiga, F. (2003). Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39, 1-9.
- Silva, P.I., Stringheta, P.C., Teófilo, R.F., Oliveira, I.R.N. (2013). Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering*, 117, 538-544.
- Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A.R., Simonic, M., Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89, 191-198.
- Suave, J., Dall'agnol, E. C., Pezzin, A. P. T., Silva, D. A. K., Meier, M. M. e Soldi, V. (2006). Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. *Health and Environment Journal*, 7, 12-20.
- Urquiaga, I., Leighton, F. (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*, 33, 55-64.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 44-84.

- Venkatesan, P., Muralidharan, C., Manavalan, R.,Valliappan, K. (2009). Selection of better method for the preparation of microspheres by applying analytic hierarchy process. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1, 64-78.
- Vizzoto, M. (2008). Amora-preta: uma fruta antioxidante. Artigo de Divulgação na Mídia Embrapa Clima Temperado.
- Wong, Y.Y., Yuan, S., Choong, C. (2011). Degradation of PEG and non-PEG alginate echitosan microcapsules in different ph environments.pp.2189-2197.
- Zafrilla, P., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F. A. (2001). Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberries (*Rubus idaeus*) jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3651-3655.

Anexos

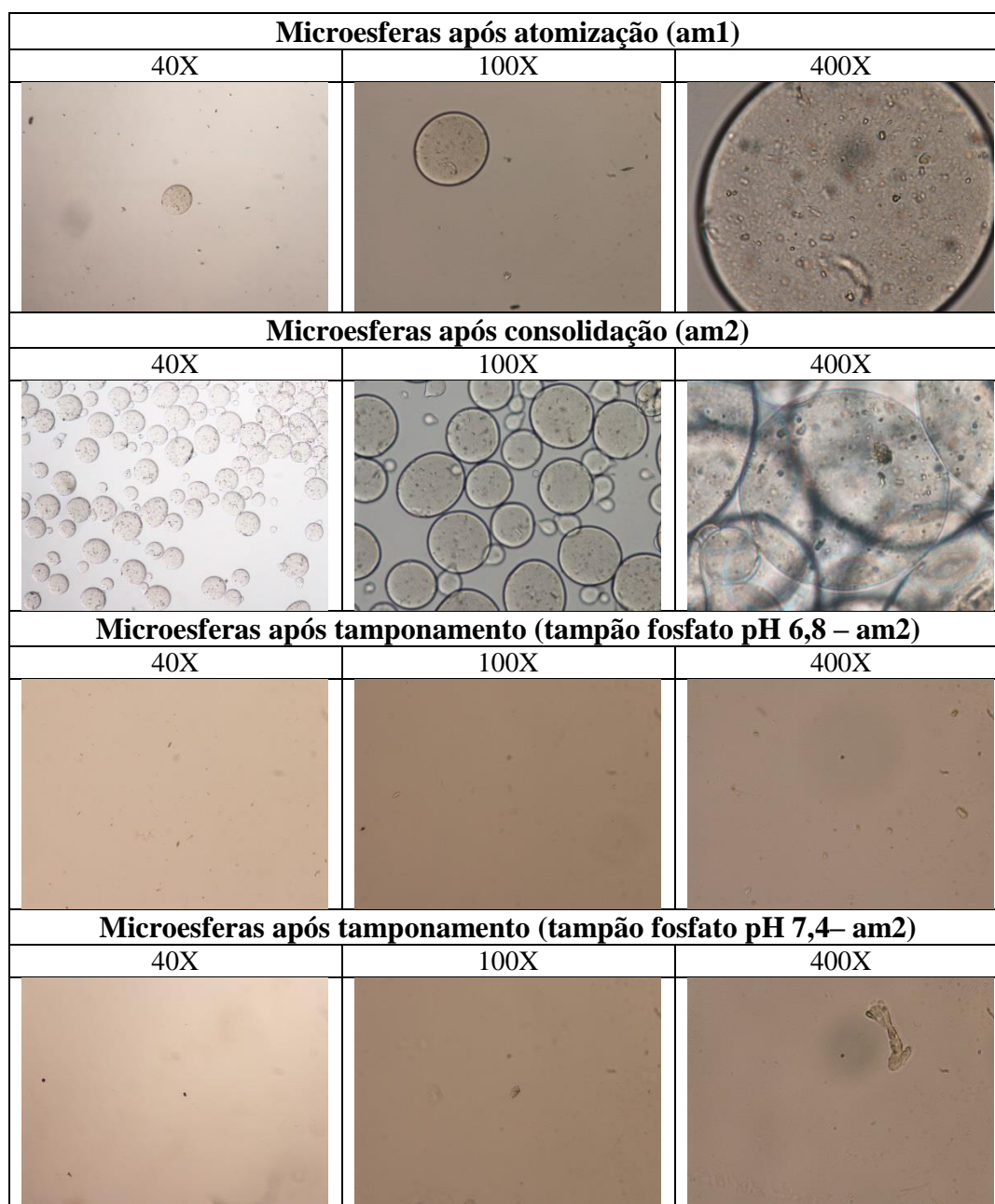
Anexo A. Registo dos resultados para os ensaios de microencapsulação

Ensaio 1

Código Ensaio	<i>Rubus ulmifolius</i>_001	Data de realização	14_03_2013
Formulação e atomização			
Fase contendo o princípio ativo		Fase de coagulação	
Princípio ativo (p.a.)	Extrato <i>Rubus ulmifolius</i>	Agente de coagulação	Cloreto de cálcio
Material de encapsulação	Alginato	Concentração do agente de coagulação	4% (s.c = 43,18g+1L)
Concentração do material de encapsulação	4% (s.a = 4g+100 mL água)	Volume da solução de coagulação	250 mL
Concentração do princípio ativo	2,5 mg/mL (50 mg+20mL H ₂ O)		
Volume de solução atomizada	6 mL		
Processo de consolidação/separação/ secagem das microesferas			
Tempo de coagulação	Atomização (am1) + 1 noite (am2)		
Procedimento de separação/lavagem	Filtração da solução de coagulação Nº de ciclos efetuados: 1X (lavagem da tina, 100 mL) Tipo de filtração utilizado: com vácuo (bomba)		
Massa final das microesferas hidratadas	2,729 g		
Secagem	n.a		
Massa final das microesferas secas	n.a		
Determinação da eficiência de encapsulação por HPLC			
Concentração do p.a. na solução de coagulação após filtração	n.a		
Massa de princípio ativo colocado no V atomizado (Mp.a. _i , mg)	15 mg		
Massa de princípio ativo não encapsulado (Mp.a. _{ne} , mg)	n.a		
Eficiência de encapsulação (EE=((Mp.a. _t -Mp.a. _{ne})/ Mp.a. _t)*100)	n.a		
Controlos adicionais do processo			
Tipo de controlo/variável medida	Adição sol. Tampão fosfato (pH 6,8 -am 2)		
Tipo de controlo/variável medida	Adição sol. Tampão fosfato (pH 7,4 -am 2)		
Tipo de controlo/variável medida	Extrato na primeira solução de lavagem – n.a		
Comentários			
A eficiência de encapsulação não foi determinada. As microesferas apresentaram morfologia desejada. Foi preparada uma solução de microesferas húmidas e tampão fosfato (a diferentes pH's) para determinar a quantidade de princípio ativo existente no interior das microesferas. O objetivo não foi conseguido, uma vez que após análise por HPLC não foram detetados derivados de ácido elágico.			

Controlo do processo por MO

Amostras analisadas: am1 e am2 (adição de solução tampão)

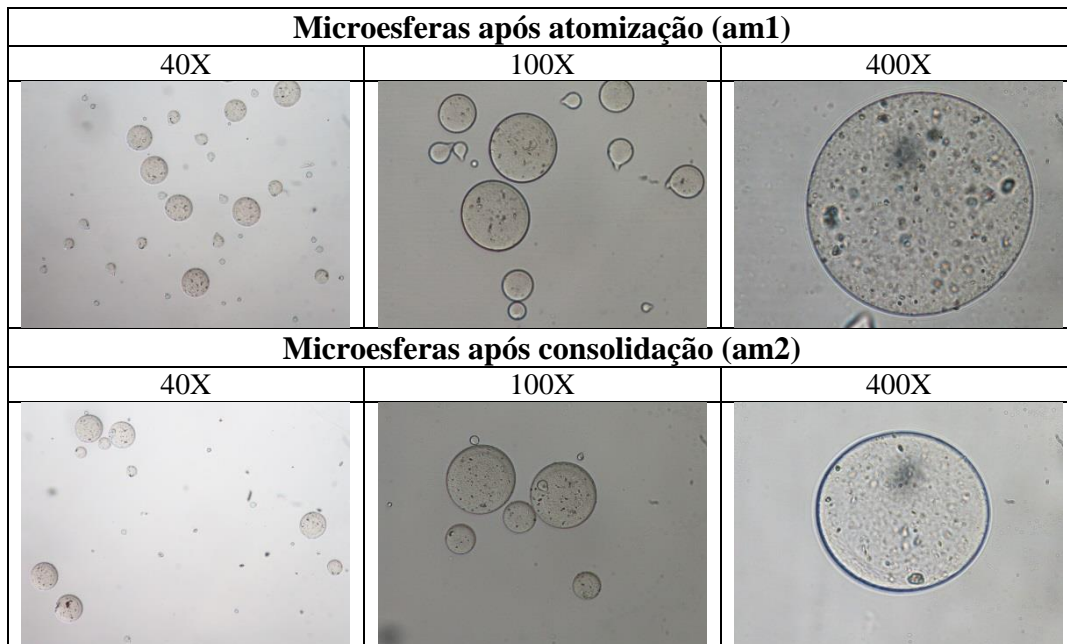


Ensaio 2

Código Ensaio	<i>Rubus ulmifolius</i>_002	Data de realização	12_06_2013
Formulação e atomização			
Fase contendo o princípio ativo		Fase de coagulação	
Princípio ativo (p.a.)	Extrato <i>Rubus ulmifolius</i>	Agente de coagulação	Cloreto de cálcio
Material de encapsulação	Alginato	Concentração do agente de coagulação	4% (s.c = 43,18g+1L)
Concentração do material de encapsulação	4% (s.a = 4g+100 mL H ₂ O)	Volume da solução de coagulação	250 mL
Concentração do princípio ativo	5 mg/mL (50 mg+10mL H ₂ O)		
Volume de solução atomizada	6 mL		
Processo de consolidação/separação/ secagem das microesferas			
Tempo de coagulação	Atomização (am1) + 4h (am2)		
Procedimento de separação/lavagem	Filtração da solução de coagulação (am3) Nº de ciclos efetuados: 1X (lavagem da tina, 50mL – am4) Tipo de filtração utilizado: com vácuo (bomba)		
Massa final das microesferas hidratadas	2,082 g		
Secagem	Processo utilizado: Liofilização (am5) Condições utilizadas (se aplicável): n.a Tempo utilizado: 2 dias		
Massa final das microesferas secas	135 mg (6,5% sólidos)		
Determinação da eficiência de encapsulação por HPLC (am3)			
Concentração do p.a. na solução de coagulação após filtração	Residual		
Massa de princípio ativo colocado no V atomizado (Mp.a. _i , mg)	30 mg		
Massa de princípio ativo não encapsulado (Mp.a. _{ne} , mg)	Residual		
Eficiência de encapsulação (EE=((Mp.a. _t -Mp.a. _{ne})/ Mp.a. _t)*100)	nd		
Controlos adicionais do processo			
Tipo de controlo/variável medida	Extrato na primeira solução de lavagem (am4) – 0,0000 mg		
Tipo de controlo/variável medida	-----		
Tipo de controlo/variável medida	-----		
Comentários			
As microesferas apresentaram morfologia desejada. A eficiência de encapsulação não foi determinada. O objetivo não foi conseguido, uma vez que após análise por HPLC não foram detetados derivados de ácido elágico.			

Controlo do processo por MO

Amostras analisadas: am1 e am2

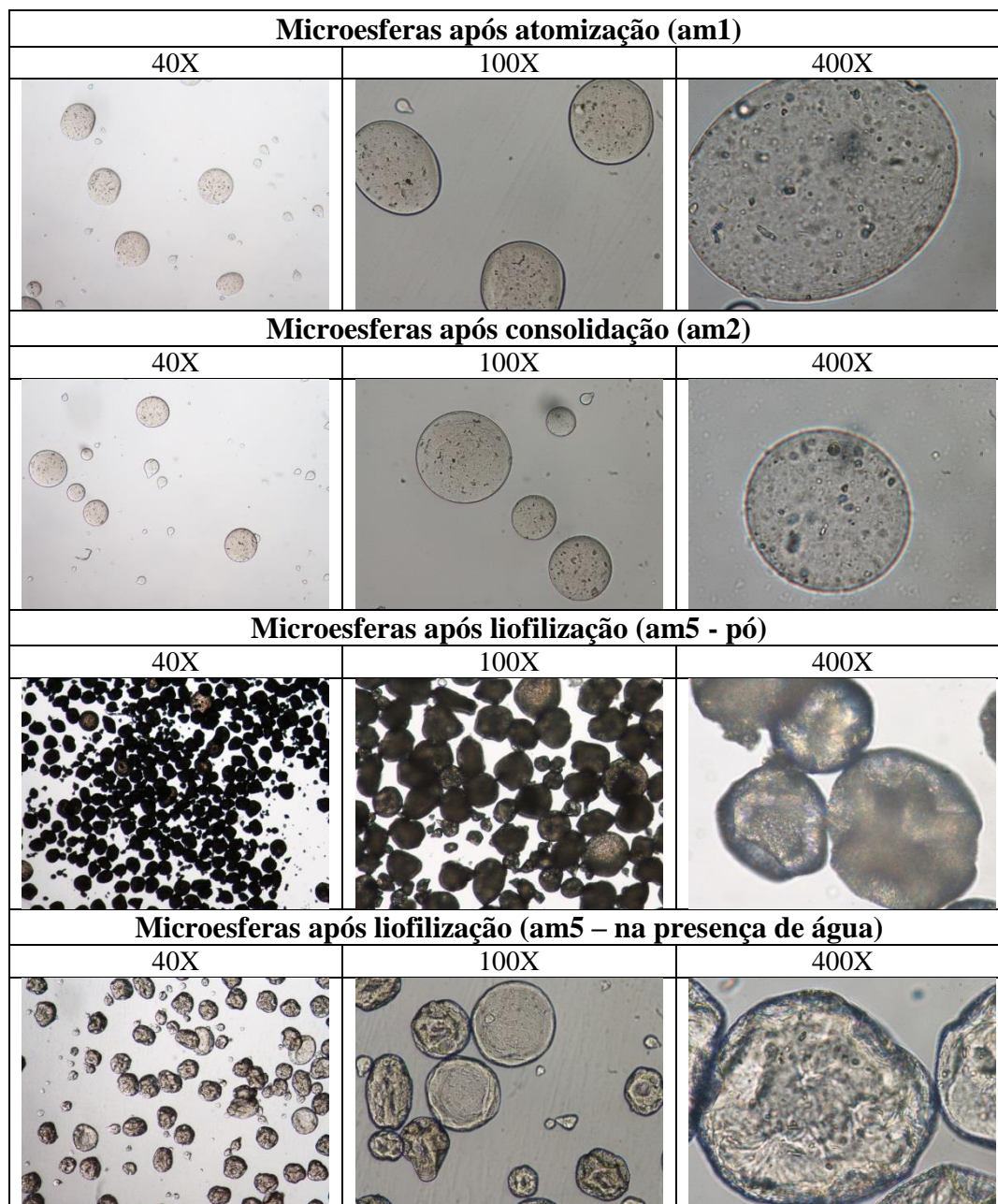


Ensaio 3

Código Ensaio	<i>Rubus ulmifolius</i> _003	Data de realização	28_06_2013
Formulação e atomização			
Fase contendo o princípio ativo		Fase de coagulação	
Princípio ativo (p.a.)	Extrato <i>Rubus ulmifolius</i>	Agente de coagulação	Cloreto de cálcio
Material de encapsulação	Alginato	Concentração do agente de coagulação	4% (s.c = 43,18g+1L)
Concentração do material de encapsulação	4% (s.a = 4g+100 mL H ₂ O)	Volume da solução de coagulação	500 mL
Concentração do princípio ativo	5 mg/mL (100 mg+20mL H ₂ O)		
Volume de solução atomizada	14 mL		
Processo de consolidação/separação/ secagem das microesferas			
Tempo de coagulação	Atomização (am1) + 4h (am2)		
Procedimento de separação/lavagem	Filtração da solução de coagulação (am3) Nº de ciclos efetuados: 1X (lavagem da tina, 100 mL – am4) Tipo de filtração utilizado: com vácuo (bomba)		
Massa final das microesferas hidratadas	4,825 g		
Secagem	Processo utilizado: Liofilização (am5) Condições utilizadas (se aplicável): n.a Tempo utilizado: 2 dias		
Massa final das microesferas secas	295 mg (6,1 % sólidos)		
Determinação da eficiência de encapsulação por HPLC (am3, am4)			
Concentração do p.a. na solução de coagulação após filtração	Residual		
Massa de princípio ativo colocado no V atomizado (Mp.a. _{ij} , mg)	70 mg		
Massa de princípio ativo não encapsulado (Mp.a. _{ne} , mg)	Residual		
Eficiência de encapsulação ($EE = ((Mp.a._i - Mp.a._ne) / Mp.a._i) * 100$)	100%		
Controlos adicionais do processo			
Tipo de controlo/variável medida	Extrato na primeira solução de lavagem (am4) – 0,00000 mg		
Tipo de controlo/variável medida	-----		
Tipo de controlo/variável medida	-----		
Comentários			
A eficiência de encapsulação foi determinada no final do processo (com base na amostragem am3 e am4) foi de cerca de 100%			

Controlo do processo por MO

Amostras analisadas: am1, am2 e am5



Anexo B. Resultados da tese: (Publicações/ Congressos)

Os resultados descritos nesta dissertação deram origem a um artigo científico e a três comunicações nacionais:

Martins, Ana; Barros, Lillian; Fernandes, Ângela; Carvalho, Ana Maria; Ferreira, Isabel C.F.R. (2013). Antioxidant activity of *Rubus ulmifolius* Schott and *Trifolium angustifolium* L. 1st Symposium on Medicinal Chemistry of Universty of Minho. Braga.

Martins, Ana; Barros, Lillian; Dueñas, Montserrat; Carvalho, Ana Maria; Buelga, Celestino Santos; Ferreira, Isabel C.F.R. (2013). Phenolic profile of hydromethanolic extract and decoction of *Rubus ulmifolius* Schott. 1st Symposium on Medicinal Chemistry of Universty of Minho. Braga.

Martins, Ana; Barros, Lillian; Carvalho, Ana Maria; Buelga, Celestino Santos; Fernandes, Isabel; Barreiro, Filomena; Ferreira, Isabel C.F.R. (2013). Extratos fenólicos de flores de *Rubus ulmifolius* Schoot: Caracterização química, microencapsulação e incorporação em iogurtes para benefícios antioxidantes. I Encontro de Jovens Investigadores do Instituto Politécnico de Bragança. Bragança.

Antioxidant activity of *Rubus ulmifolius* Schott and *Trifolium angustifolium* L.

Ana Martins, Lillian Barros, Ângela Fernandes, Ana Maria Carvalho, Isabel C.F.R. Ferreira*

Centro de Investigação de Montanha (CIMO), ESA, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal.

*fferreira@ipb.pt

Rubus ulmifolius Schott (wild blackberry) from Rosaceae and *Trifolium angustifolium* L. (narrowleaf crimson clover) from Fabaceae are widespread medicinal plants from Portuguese wild flora. These species are common in the Iberian Peninsula, growing spontaneously under conditions of Mediterranean climate and being commonly used in folk medicine [1]. In Portugal, local consumers consider that the decoctions of *R. ulmifolius* have anti-inflammatory and analgesic properties and may be administered orally for the treatment of diabetes, diarrhea, and menopause [2]. They are also externally applied to relieve hoarseness, inflamed gums, sores and skin ulcers [2]. *T. angustifolium* is a species known for centuries in folk medicine due to its phytochemical characteristics and biological activity. The decoction of its inflorescences is used to treat stomach affections and to control diarrhea [3]. This work aimed to evaluate the antioxidant properties of methanolic extracts and decoctions of *R. ulmifolius* flower buds and *T. angustifolium* inflorescences. Four *in vitro* assays were performed: scavenging effects on DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radicals, reducing power, inhibition of β -carotene bleaching and inhibition of lipid peroxidation in brain cell homogenates by TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) assay. Methanolic extracts proved to have higher antioxidant activity than the corresponding decoctions. *R. ulmifolius* revealed the highest antioxidant activity in all the assays ($EC_{50} \leq 70 \mu\text{g/mL}$ for the methanolic extract and $EC_{50} \leq 200 \mu\text{g/mL}$ for the decoction). The studied medicinal plants have interesting antioxidant properties that are certainly related to the presence of phenolic compounds (reported in another abstract present to this symposium) and could be explored as a source of antioxidants for food preservation or pharmaceutical uses.

Acknowledgments:

The authors are grateful to FCT for financial support to CIMO (strategic project PEst-OE/AGR/UI0690/2011). L. Barros and A. Fernandes also thank to FCT, POPH-QREN and FSE for their grants (SFRH/BPD/4609/2008 and SFRH/BD/76019/2011, respectively).

References:

- [1] A.M. Carvalho. Biblioteca de Ciencias, 35. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, **2010**.
- [2] J.M. Neves, C. Matos, C. Moutinho, G. Queiroz, L.R. Gomes. *J. Ethnopharm.*, **2009**, 124, 270-283.
- [3] S.D. Acqua, R. Cervellati, M.C. Loi, G. Innocenti. *Food Chem.*, **2008**, 106, 745-749.

Antioxidant activity of *Rubus ulmifolius* Schott and *Trifolium angustifolium* L.

Ana Martins, Lillian Barros, Ângela Fernandes, Ana Maria Carvalho, Isabel C.F.R. Ferreira*

Centro de Investigação de Montanha (CIMO), ESA, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal.

*iferreira@ipb.pt

INTRODUCTION

Rubus ulmifolius Schott (wild blackberry) from Rosaceae and *Trifolium angustifolium* L. (narrowleaf crimson clover) from Fabaceae are widespread medicinal plants from Portuguese wild flora.

These species are common in the Iberian Peninsula, growing spontaneously under conditions of Mediterranean climate and being commonly used in folk medicine [1].

In Portugal, local consumers consider that the decoctions of *R. ulmifolius* have anti-inflammatory and analgesic properties and may be administered orally for the treatment of diabetes, diarrhea, and menopause. They are also externally applied to relieve hoarseness, inflamed gums, sores and skin ulcers [2].

T. angustifolium is a species known for centuries in folk medicine due to its phytochemical characteristics and biological activity.

The decoction of its inflorescences is used to treat stomach affections and to control diarrhea [3].



Figure 1. *Rubus ulmifolius* Schott.



Figure 2. *Trifolium angustifolium* L.

MATERIALS AND METHODS

This work aimed to evaluate the antioxidant properties of methanolic extracts and decoctions of *R. ulmifolius* flower buds and *T. angustifolium* inflorescences.

Four in vitro assays were performed: scavenging effects on DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radicals, reducing power, inhibition of β -carotene bleaching and inhibition of lipid peroxidation in brain cell homogenates by TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) assay.

RESULTS AND DISCUSSION

Methanolic extracts proved to have higher antioxidant activity than the corresponding decoctions. *R. ulmifolius* revealed the highest antioxidant activity in all the assays ($EC_{50} \leq 70 \mu\text{g/mL}$ for the methanolic extract and $EC_{50} \leq 200 \mu\text{g/mL}$ for the decoction).

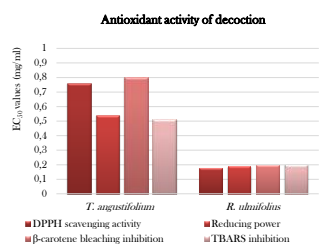


Figure 3. Antioxidant activity of decoction wild *T. angustifolium* and *R. angustifolium*.

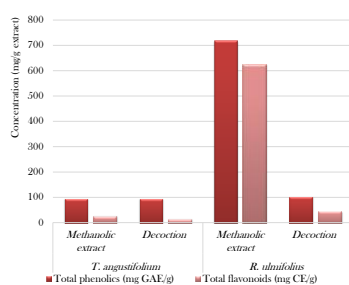


Figure 4. Total phenolic and flavonoids contents in methanolic extracts and infusions of wild *T. angustifolium* and *R. angustifolium*.

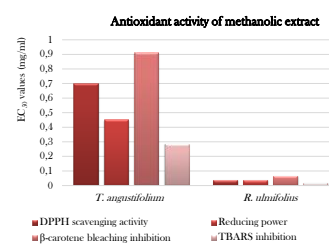


Figure 5. Antioxidant activity of methanolic extract of wild *T. angustifolium* and *R. angustifolium*.

CONCLUSION

The studied medicinal plants have interesting antioxidant properties that are certainly related to the presence of phenolic compounds (reported in another abstract present to this symposium) and could be explored as a source of antioxidants for food preservation or pharmaceutical uses.

Acknowledgments: The authors are grateful to FCT for financial support to CIMO (strategic project PEst-OE/AGR/UI0690/2011). L. Barros and A. Fernandes also thank to FCT, POPH-QREN and FSE for their grants (SFRH/BPD/4609/2008 and SFRH/BD/76019/2011, respectively).

References: [1] A.M. Carvalho, Biblioteca de Ciencias, 35. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2010. [2] J.M. Neves, C. Matos, C. Moutinho, G. Queiroz, L.R. Gomes, *J. Ethnopharm.*, 2009, 124, 270-283. [3] S.D. Acqua, R. Cervellati, M.C. Loi, G. Innocenti, *Food Chem.*, 2008, 106, 745-749.

Phenolic profile of hydromethanolic extract and decoction of *Rubus ulmifolius* Schott

Ana Martins^a, Lillian Barros^{a,b}, Montserrat Dueñas^b, Ana Maria Carvalho^a, Celestino Santos-Buelga^b, Isabel C.F.R. Ferreira^{a,*}

^aCentro de Investigação de Montanha (CIMO), ESA, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal.

^bGrupo de Investigación en Polifenoles (GIP-USAL), Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain.

*iferreira@ipb.pt

Rubus ulmifolius Schott (Rosaceae), known as wild blackberry, is a perennial shrub found in wild and cultivated habitats in Europe, Asia and North Africa [1]. Traditionally, *R. ulmifolius* is considered to be anticatarrhal, antiseptic, diuretic, anti-inflammatory, antioxidant, astringent, and antispasmodic. Oral dosage forms are used for diarrhea, menstrual pain, menopause disorders, liver diseases, aphtha, gingivitis, hypertension and diabetes [2]. Different classes of bioactive constituents are present in *R. ulmifolius*, including phenolic compounds. This study aimed to determine the phenolic composition of different preparations (decoction and hydromethanolic extract) of *R. ulmifolius* flower buds. The analysis of phenolic compounds was carried out by reversed-phase high performance liquid chromatography coupled to diode array detection and mass spectrometry with electron spray ionization (HPLC-DAD-ESI/MS), in order to establish the specific phenolic profile of each preparation. The phenolic profile of both preparations was identical, varying only in the concentrations found. Twenty-three phenolic compounds were identified in both samples, in which seven were identified as phenolic acids (di- and caffeoylquinic, *p*-coumaroylquinic and feruloylquinic acids), ten flavonoids (quercetin and kaempferol derivatives and catechin), and five ellagitannin derivatives (lambertianin and di-HHDP-galloyl glucose). These compounds were found in both preparations. The most abundant compounds found were ellagitannin derivatives, such as lambertianin and di-HHDP-galloyl glucose. Gasperotti et al. [3] have identified these compounds in *R. fruticosus* fruits. To our knowledge, this is the first time that these compounds were identified and quantified in *R. ulmifolius* flowers buds.

Acknowledgments:

The authors are grateful to FCT for financial support to CIMO (strategic project PEst-OE/AGR/UI0690/2011). L. Barros also thanks to FCT, POPH-QREN and FSE for her grant (SFRH/BPD/4609/2008). The GIP-USAL is financially supported by the Spanish Government through the *Consolider-Ingenio 2010* Programme (FUN-C-FOOD, CSD2007-00063). M. Dueñas thanks to the *Programa Ramón y Cajal* for a contract.

References:

- [1] E. Monasterio-Huelin, *Rubus* L. in Castroviejo, S. (coord. Gen.). S. Flora Iberica. Vol VI, **2001**
- [2] M.H. Novais, I. Santos, S. Mendes, C. Pinto-Gomes. *J. Ethnopharm.*, **2004**, 93, 183-195
- [3] M. Gasperotti, D. Masuero, U. Vrhovsek, Q. Quella, F. Mattivi. *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, 58, 4602-4616

INTRODUCTION

Rubus ulmifolius Schott (Rosaceae), known as wild blackberry, is a perennial shrub found in wild and cultivated habitats in Europe, Asia and North Africa [1].

Traditionally, *R. ulmifolius* is considered to be anticatarrhal, antiseptic, diuretic, anti-inflammatory, antioxidant, astringent, and antispasmodic. Oral dosage forms are used for diarrhea, menstrual pain, menopause disorders, liver diseases, aphtha, gingivitis, hypertension and diabetes [2]. Different classes of bioactive constituents are present in *R. ulmifolius*, including phenolic compounds.

MATERIALS AND METHODS

This study aimed to determine the phenolic composition of different preparations (decoction and hydromethanolic extract) of *R. ulmifolius* flower buds.

The analysis of phenolic compounds was carried out by reversed-phase high performance liquid chromatography coupled to diode array detection and mass spectrometry with electron spray ionization (HPLC-DAD-ESI/MS), in order to establish the specific phenolic profile of each preparation.

The phenolic profile of both preparations was identical, varying only in the concentrations found.

RESULTS AND DISCUSSION

Twenty-three phenolic compounds were identified in both samples, in which six were identified as phenolic acids (di- and caffeoylquinic, p-coumaroylquinic and feruloylquinic acids), eleven flavonoids (quercetin and kaempferol derivatives and catechin), and six ellagitannin derivatives (lambertianin and di-HHDP-galloyl glucose). These compounds were found in both preparations. The most abundant compounds found were ellagitannin derivatives, such as lambertianin and di-HHDP-galloyl glucose (Table 1). Gasperotti et al. [3] have identified these compounds in *R. fruticosus* fruits.

Table 1. Retention time (Rt), wavelengths of maximum absorption in the visible region (λ_{max}), mass spectral data and tentative identification of phenolic compounds of *Rubus ulmifolius* Schott.

Peak	Rt (min)	λ_{max} (nm)	Molecular ion [M-H] ⁻ (m/z)	MS ⁿ (m/z)	Tentative identification
1	5.34	386	358	191(100),179(67),178(6),185(50)	3-O-Caffeoylquinic acid
2	6.96	310	387	191(18),178(6),168(100),119(58)	3-p-coumaroylquinic acid
3	8.04	386	367	198(100),191(5),178(9),184(35)	3-O-Feruloylquinic acid
4	9.14	313	-	163(8),119(10)	p-coumaroyl derivative
5	10.20	278	289	245(38),203(73),137(45)	Catechin
6	14.08	251/363	1350 ^a	933(3),638(12),301(9)	Lambertianin Olike ellagitannin
7	14.88	251/363	935	638(18),301(53)	Di-HHDP-galloyl glucose
8	16.38	348	1567 ^a	1235(3),935(100),783(3),638(29),301(8)	Sanguin H-10 like structure
9	17.05	256/356	935	638(31),301(51)	Di-HHDP-galloyl glucose
10	17.96	256/354	935	638(3),301(34)	Di-HHDP-galloyl glucose
11	18.69	251/363	1118 ^a	933(6),638(6),618,468(62),315(5),301(7)	Sanguin H-6 plus one gallic acid moiety
12	18.85	354	609	301(100)	Quercetin 3-O-rutinoside
13	19.64	354	477	301(100)	Quercetin O-glucuronide
14	19.88	354	468	301(100)	Quercetin 3-O-glucoside
15	20.25	348	468	301(100)	Quercetin O-glucoside
16	21.91	348	578	385(100)	Kaempferol O-pentose glucoside
17	22.01	338	515	358(100),191(90),179(58),178(3),185(27)	3,5-Di-Caffeoylquinic acid
18	22.07	354	598	385(100)	Kaempferol 3-O-rutinoside
19	22.65	350	447	385(100)	Kaempferol O-glucoside
20	23.54	347	461	385(100)	Kaempferol O-glucuronide
21	23.84	347	447	385(100)	Kaempferol 3-O-glucoside
22	24.74	338	515	358(68),191(38),179(63),178(100),185(50)	4,5-Di-Caffeoylquinic acid
23	26.28	354	489	385(100)	Kaempferol acylheroside

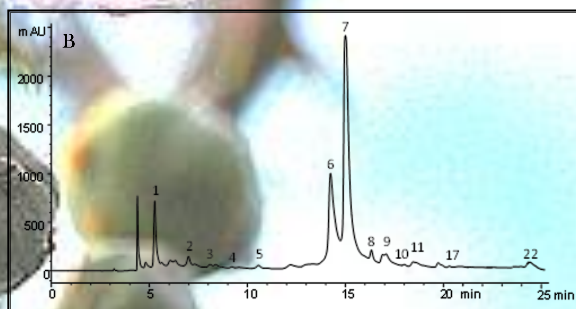
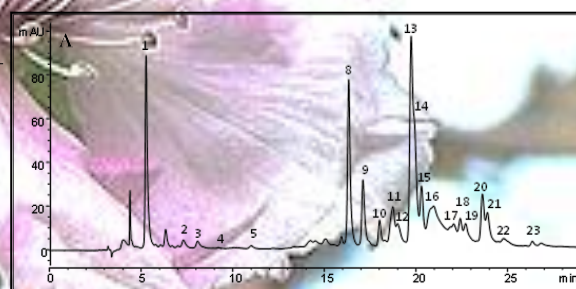


Figure 1. HPLC phenolic profile of *Rubus ulmifolius*, obtained at 370 nm (A) and 280 nm (B) for flavonoids and phenolic acids, respectively.

CONCLUSION

To our knowledge, this is the first time that these compounds were identified and quantified in *R. ulmifolius* flowers buds.

Acknowledgments: The authors are grateful to FCT for financial support to CIMO (strategic project PEst-OE/AGR/UI0690/2011). L. Barros also thanks to FCT, POPH-QREN and FSE for her grant (SERII/BPD/4609/2008). The GIP-USAL is financially supported by the Spanish Government through the Consolidator-Ingenuo 2010 Programme (FUN-C-FOOD, CSD2007-00063). M. Dueñas thanks to the Programa Ramón y Cajal for a contract.

References: [1] E. Monasterio-Huelin, Rubus L. in Castroviejo, S. (coord. Gen.), S. Flora Iberica, Vol VI, 2001
[2] M.H. Novais, I. Santos, S. Mendes, C. Pinto-Gomes, J. Ethnopharmac., 2004, 93, 183-195
[3] M. Gasperotti, D. Masuero, U. Vrhovsek, Q. Quella, F. Mattivi, J. Agric. Food Chem., 2010, 58, 4602-4616

EXTRATOS FENÓLICOS DE FLORES DE *RUBUS ULMIFOLIUS* SCHOOT: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, MICROENCAPSULAÇÃO E INCORPORAÇÃO EM IOGURTES PARA BENEFÍCIOS ANTIOXIDANTES

Ana Martins^{1,3}, Lillian Barros,^{1,2} Ana Maria Carvalho,¹ Celestino Santos-Buelga,² Isabel P. Fernandes,³ Filomena Barreiro,³ Isabel C.F.R. Ferreira^{1,*}

¹Centro de Investigação de Montanha (CIMO), ESA, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal.

²GIP-USAL, Faculdade de Farmácia, Universidade de Salamanca, Espanha.

³Laboratório de Processos de Separação e Reação (LSRE), Laboratório associado LSRE/LCM, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal

*iferreira@ipb.pt

Resumo

Rubus ulmifolius Schoot (Rosaceae), conhecida como amora silvestre, é um arbusto perene encontrado em *habitats* silvestres e cultivados da Europa, Ásia e África do Norte. Tradicionalmente é conhecido pelas suas propriedades medicinais, incluindo atividade antioxidante. Neste trabalho caracterizaram-se quimicamente dois extratos fenólicos obtidos a partir de botões florais de *R. ulmifolius*, decocção e extrato hidroalcoólico, tendo sido identificados vários compostos fenólicos, maioritariamente derivados de elagitaninos nomeadamente, os isómeros sanguiin H-10 e lambertianina.

Comparativamente à decocção, o extrato hidroalcoólico apresentou um conteúdo em compostos fenólicos superior e uma maior atividade antioxidante. A sua forma liofilizada foi a escolhida para microencapsular pela técnica de *spray* seguida de coagulação tendo-se produzido microesferas de alginato que foram posteriormente incorporadas num iogurte natural. Os resultados obtidos mostraram que o extrato microencapsulado originou produtos com atividade antioxidante superior e com melhor preservação desta ao longo do tempo. Ambas as formas (extrato direto e microencapsulado) mostraram maior atividade que o controlo. Em síntese, os resultados obtidos demonstraram o potencial antioxidante do extrato hidroalcoólico *R. ulmifolius* e a eficiência da microencapsulação para a sua preservação, abrindo assim possibilidades para a sua exploração em aplicações na indústria alimentar.

Palavras-chave: Antioxidantes; compostos fenólicos; iogurte funcional; microencapsulação; *Rubus ulmifolius*.

Agradecimentos

Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) pelo apoio financeiro ao CIMO (projeto estratégico PEst-OE/AGR/UI0690/2011) e ao LSRE (projeto estratégico PEst-C/EQB/LA0020/2011). L. Barros agradece ao FCT, POPH-QREN e FSE pelo seu contrato de investigação no âmbito do “Programa Compromisso com Ciência-2008”. O GIP-USAL é financeiramente suportado pelo governo espanhol através do Programa *Consolider-Ingenio 2010* (FUN-C-FOOD, CSD2007-00063).

